

**Universidade de Lisboa**

**Faculdade de Ciências**

**Departamento de Química e Bioquímica**



**Funcionalização de nanopartículas de  
óxidos de ferro para aplicação em  
biossensores**

Filipa Isabel Fonseca Henriques

**Dissertação**

**Mestrado em Química**

Especialização em Química

**2013**



**Universidade de Lisboa**

**Faculdade de Ciências**

**Departamento de Química e Bioquímica**



**Funcionalização de nanopartículas de  
óxidos de ferro para aplicação em  
biossensores**

Filipa Isabel Fonseca Henriques

**Mestrado em Química**

Orientadoras:

Doutora Ana Silveira Viana

Doutora Maria de Deus Carvalho

**2013**



"Eu sou o mestre do meu destino e  
o comandante da minha alma!"

*"I am the master of my fate and  
The captain of my destiny"*

Nelson Mandela



## **Agradecimentos**

Às minhas orientadoras, Dra. Maria de Deus Carvalho e Dra. Ana Silveira Viana, o meu reconhecimento, do fundo do meu coração, pelos saberes que me transmitiram, pelo apoio e tempo que dispensaram comigo.

Ao grupo de eletroquímica, nomeadamente à Inês Almeida, Dr. Jorge Correia, Dra. Ana Melato, Dra. Virgínia Ferreira, Dra. Olinda Monteiro, Joana Cabrita, Joaquim Marquês e Sara Realista, pelos conselhos e apoio constante. Em especial, à Isabel Ornelas por estar sempre presente na minha vida, por me apoiar nos maus e bons momentos.

Ao Artur e Edmundo Verdades, pelas palavras amigas.

Agradeço profundamente aos meus pais e irmão pelo apoio incondicional, paciência, força e amor que me deram.

À minha avó por ter enriquecido a minha vida e por me ter ensinado, com o seu exemplo, a nunca desistir e parar de lutar.

A minha profunda estima vai para todos os que de qualquer modo me apoiaram nesta fase da minha vida.





## Resumo

O presente trabalho visa explorar a (bio)funcionalização de nanopartículas de tipo magnetite,  $\text{Fe}_{3-x}\text{O}_4$ , (NPs), tendo em vista a sua aplicação no desenvolvimento de biossensores.

Foram utilizadas NPs de 7, 20 e 60 nm, que foram testadas com  $\text{CS}_2$  e um ditiol, utilizando uma metodologia de um só passo para efetuar a sua imobilização num elétrodo de ouro (Au (111)). As NPs foram estudadas por voltametria cíclica, de forma a confirmar a sua presença nos eléttodos modificados. Os melhores resultados foram obtidos com  $\text{CS}_2$ , detetando-se um processo redox melhor definido, atribuído à oxidação da magnetite ( $E_{1/2} = 0.4 \text{ V vs. SCE}$ ). A variação linear da corrente de pico do processo de oxidação *versus* velocidade de varrimento indicou que as nanopartículas estão adsorvidas de um modo estável à superfície do ouro. Sendo o objetivo deste trabalho a imobilização de biomoléculas em superfícies de ouro modificadas com NPs, fez-se um estudo prévio da reação do  $\text{CS}_2$  com epinefrina (composto contendo uma amina) para a formação de um ditiocarbamato, que estabelece uma ligação forte com ouro. Nestes estudos verificou-se que na presença de NPs foi possível adsorver maior quantidade de epinefrina no elétrodo.

Finalmente testou-se esta metodologia utilizando um enzima, lacase, verificando-se por estudos eletroquímicos que esta preserva a sua atividade catalítica para um composto fenólico. Usando as NPs de 60 nm verificou-se, por cronoamperometria, uma melhor atividade catalítica para o substrato estudado, com uma gama linear entre  $1 \times 10^{-7}$  a  $1.2 \times 10^{-6} \mu\text{mol L}^{-1}$ .

Os eléttodos modificados e as NPs funcionalizadas foram caracterizados por técnicas microscópicas e espectroscópicas, permitindo confirmar a presença das NPs e de enzimas no ouro, e também a modificação das NPs com epinefrina e lacase. Demonstrou-se assim, a potencialidade da metodologia de funcionalização com base no  $\text{CS}_2$ , para preparar superfícies nanoestruturadas com biomoléculas, relevantes para biossensores.

Palavras-chaves: (bio)funcionalização, magnetite, biossensores, epinefrina, lacase, dissulfureto de carbono ( $\text{CS}_2$ ).



## Abstract

The present work's objective was to explore the (bio)functionalization of magnetite type nanoparticles  $\text{Fe}_{3-x}\text{O}_4$  (NPs), aiming their application in the development of biosensors.

The immobilization of the NPs (with 7, 20 and 60 nm) was tested with  $\text{CS}_2$  and a dithiol, through a one-step methodology to immobilize them on a gold electrode (Au(111)). The NPs presence on the modified electrodes was confirmed by cyclic voltammetry. The best results were obtained with  $\text{CS}_2$ , which resulted in a better defined pair of redox peaks, attributed to the magnetite oxidation ( $E_{1/2} = 0.4$  V vs. SCE). The linear variation of the peak current vs. the scan rate indicates that the NPs were stably immobilized on the gold surface.

In order to pursue the main objective, immobilization of biomolecules on a gold surface, the reaction of  $\text{CS}_2$  with epinephrine (a compound with an amine group) through the formation of a dithiocarbamate, which forms a stable bond with Au(111), was studied. It was observed that in the presence of NPs, a higher amount of epinephrine was adsorbed on the electrode surface.

Finally, the same methodology was employed to immobilize an enzyme, laccase. Electrochemical studies revealed that this biomolecule preserves its catalytic activity toward a phenolic compound, and the best results were obtained using the 60 nm NPs, for which the catalytic activity was improved, resulting in a linear response range from  $1 \times 10^{-7}$  to  $1.2 \times 10^{-6} \mu\text{mol L}^{-1}$ .

Spectroscopic and microscopic techniques were used to characterize the modified electrodes, confirming the presence of NPs and enzymes on their surface, as well as the functionalization of the NPs with epinephrine and laccase.

Thus, it was possible to conclude that the proposed functionalization methodology, based on  $\text{CS}_2$ , is a potential alternative, to prepare nanostructured surfaces with biomolecules, relevant to the development of biosensors.

**Keyword:** (bio)functionalization, magnetite, biosensors, epinephrine, laccase, carbon disulfide ( $\text{CS}_2$ )



## Índice de figuras

<b>Figura 1.1</b> - Biossensor para análise de glicose no sangue (On-Call®).-----	3
<b>Figura 1.2</b> - Estrutura esquemática de um biossensor.-----	4
<b>Figura 1.3</b> – Ilustração do reconhecimento do analito ao entrar em contato com a biocamada. -----	4
<b>Figura 1.4</b> – Representação esquemática de uma monocamada auto-montada: (1) Grupo cabeça/âncora, (2) cauda e (3) grupo funcional.-----	8
<b>Figura 1.5</b> - Formação de ditiocarbamato num substrato de Au(111), na presença de uma amina e dissulfureto de carbono. -----	9
<b>Figura 1.6</b> – Estrutura cristalina do enzima lacase (cobre do tipo T1, T2 e T3) <sup>[48]</sup> .-----	10
<b>Figura 1.7</b> - Metodologia utilizada para a modificação da superfície de ouro com CS <sub>2</sub> , nanopartículas de óxido de ferro e um composto contendo amina (epinefrina ou lacase).-----	11
<b>Figura 2.1</b> – (a) Célula eletroquímica utilizada e (b) Elétrodo de trabalho de Au (111) ---	16
<b>Figura 2.2</b> - Esquema representativo da metodologia utilizada para a modificação da superfície do Au(111) com as NPs fisicamente adsorvidas nos elétrodos-----	18
<b>Figura 2.3</b> – Esquema representativo da metodologia usada para a modificação da superfície de ouro: (a)Au(111)/CS <sub>2</sub> /NPs, (b)Au(111)/CS <sub>2</sub> /NPs /Epinefrina, (c) Au(111)/CS <sub>2</sub> /NPs /Lacase.-----	19

<b>Figura 2.4</b> - Voltamograma cíclico de um processo redox reversível de uma espécie adsorvida à superfície do eletrodo -----	22
<b>Figura 2.5</b> - Voltamograma cíclico de um processo redox reversível de uma espécie adsorvida à superfície do eletrodo -----	23
<b>Figura 2.6</b> – Variação típica da corrente em função do tempo na técnica de cronoamperometria. -----	25
<b>Figura 2.7</b> - Instrumentação utilizada nos estudos eletroquímicos: potencióstato, caixa de Faraday e computador. -----	26
<b>Figura 2.8</b> - Esquema representativo dos modos de operação em SPM (adaptado de <sup>[69]</sup> ). -----	28
<b>Figura 2.9</b> - Esquematização do funcionamento de um microscópio de força atômica (adaptado de <sup>[66]</sup> ). -----	28
<b>Figura 2.10</b> – Gráfico ilustrativo das forças estabelecidas entre a amostra e a ponta num estudo por AFM, em função da distância que as separa, evidenciando as regiões correspondentes aos modos operativos (figura adaptada <sup>[70]</sup> ). -----	29
<b>Figura 2.11</b> – Imagem do microscópio de força atômica utilizado neste trabalho. -----	30
<b>Figura 2.12</b> - Microscópio eletrônico de transmissão. -----	31
<b>Figura 3.1</b> - Imagens TEM dos 3 tipos de NPs utilizadas, com tamanho médio de (a) 7 nm, (b) 20 nm e (c) 60 nm. -----	37
<b>Figura 3.2</b> - Imagens de AFM e respetiva análise de secção das NPs com tamanhos médios de (a) 7 nm (b) 20 nm (c) 60 nm sobre mica. -----	38

<b>Figura 3.3</b> - Metodologias utilizadas para a modificação da superfície do Au(111): (a) Au(111)/CS <sub>2</sub> ; (b) Au(111)/CS <sub>2</sub> /NPs -----	40
<b>Figura 3.4</b> - Voltamogramas cíclicos obtidos em 0.1 mol L <sup>-1</sup> PBS (pH 7) de: (a) Au(111), (b) Au(111)/CS <sub>2</sub> , (c) Au(111)/CS <sub>2</sub> /NP20 ( $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ ).-----	41
<b>Figura 3.5</b> - (a) Voltamogramas cíclicos de Au (111) modificado com CS <sub>2</sub> e NP60 em PB-Cit 0.1 mol L <sup>-1</sup> (pH 4.6) e a diferentes velocidades de varrimento [300 – 5] mV s <sup>-1</sup> , (b) Representação gráfica de $i_p$ vs $v$ . -----	41
<b>Figura 3.6</b> - Voltamogramas cíclicos de Au (111) modificado com CS <sub>2</sub> e diferentes NPs, (a) NP60, (b) NP20, (c) NP7, em PBS 0.1 mol L <sup>-1</sup> (pH 7), $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ e respectivas representações gráficas de $i_p$ vs $v$ .-----	42
<b>Figura 3.7</b> - Imagens de AFM do elétrodo de ouro limpo (a) sem tratamento térmico (b) e (c) com tratamento térmico ( <i>flamming annealing</i> ) -----	44
<b>Figura 3.8</b> - Imagens de AFM da superfície do elétrodo de ouro modificado com CS <sub>2</sub> e NP60. Análise de secção da figura (c)-----	45
<b>Figura 3.9</b> - Voltamogramas cíclicos do estudo redox dos elétrodos modificados com NPs e CS <sub>2</sub> ou NPs e ditiol em PBS 0.1 mol L <sup>-1</sup> (pH 7) e $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ : (a) NP60, (b) NP7. -----	46
<b>Figura 3.10</b> - Metodologia utilizada para a modificação da superfície do Au(111) com as NPs fisicamente adsorvidas à sua superfície -----	47
<b>Figura 3.11</b> - Voltamogramas cíclicos do elétrodo de Au(111) e das NPs adsorvidas fisicamente à sua superfície e $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ : (a) Elétrodo limpo, (b) NP20 em PB 0.1 mol L <sup>-1</sup> (pH 7), (c) NP20 em PB-Cit 0.1 mol L <sup>-1</sup> (pH 4.6). -----	47

**Figura 3.12** - Representação do processo redox reversível das formas hidroquinona /quinona, da epinefrina.----- 48

**Figura 3.13** - Voltamograma cíclico de 1 mmol L<sup>-1</sup> de epinefrina em solução, em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.1 mol L<sup>-1</sup> e v = 50 mV s<sup>-1</sup> [47] . ----- 49

**Figura 3.14** – Voltamograma cíclico de 2.0 x 10<sup>-2</sup> mmol L<sup>-1</sup> de epinefrina em solução, em 0.1 mol L<sup>-1</sup> PBS (pH 6) e v = 100 mV s<sup>-1</sup> [86] . ----- 49

**Figura 3.15** - Oxidação eletroquímica da epinefrina [88] ----- 50

**Figura 3.16** - Metodologia utilizada para a modificação da superfície do eletrodo: (a) Au(111)/CS<sub>2</sub>/Epinefrina ; (b) Au(111)/CS<sub>2</sub>/NPs/Epinefrina. ----- 50

**Figura 3.17** - Voltamogramas cíclicos do estudo redox a 50 mV s<sup>-1</sup> em diferentes eletrólitos. (a) Au(111)/CS<sub>2</sub>/Epinefrina e (b) Au(111)/CS<sub>2</sub>/NP20/Epinefrina.----- 51

**Figura 3.18** - Representações gráficas de i<sub>p</sub> vs v do eletrodo Au(111)/CS<sub>2</sub>/NP20/Epinefrina em (a) PBS 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 7), (b) PB-Cit 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 4.6).**Erro! Marcador não definido.**

**Figura 3.19** - Voltamogramas cíclicos do eletrodo Au(111)/CS<sub>2</sub>/NP20/Epinefrina, v = 5 mV s<sup>-1</sup> com: (a) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.05 mol L<sup>-1</sup> (pH 1) e (b) PBS 0.1 mol L<sup>-1</sup> (pH 7).**Erro! Marcador não definido.**55

**Figura 3.20** - Voltamogramas cíclicos dos eletrodos Au(111)/CS<sub>2</sub>/Epinefrina e de Au(111)/CS<sub>2</sub>/NPs/Epinefrina, com nanopartículas de 7, 20 e 60 nm , com eletrólito H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.05 mol L<sup>-1</sup> (pH 1) e v = 50 mV s<sup>-1</sup>.-----55

**Figura 3.21** - Imagens de AFM da superfície do eletrodo de ouro modificado com CS<sub>2</sub>, nanopartículas de 60 nm e epinefrina. ----- 57



**Figura 3.22** – Espectros de UV-Vis: (a) Em solução sem NPS (b) e (c) Dispersão com NP60.

----- 58

**Figura 4.1** – Mecanismo geral da ação da lacase (figura adaptada <sup>[51]</sup> ). ----- 63

**Figura 4.2** – Representação esquemática das reações envolvidas na atividade catalítica da lacase na presença de ABTS (figura adaptada <sup>[95]</sup> ). ----- 64

**Figura 4.3** – Tendência esperada para a atividade do enzima lacase em função do pH na presença do substrato ABTS (figura adaptada <sup>[65]</sup> ) ----- 65

**Figura 4.4** - Metodologia utilizada para a modificação da superfície do Au(111): (a) Au(111)/CS<sub>2</sub>/NPs; (b) Au(111)/CS<sub>2</sub>/Lacase; (c) Au(111)/CS<sub>2</sub>/NPs/Lacase. ----- 66

**Figura 4.5** - Voltamograma cíclico de 0.5 mmol L<sup>-1</sup> ABTS, 50 mV s<sup>-1</sup> em 0.1 mol L<sup>-1</sup> PB-Cit (pH 4.5)<sup>[47]</sup> ----- 67

**Figura 4.6** - (a) Voltamogramas cíclicos do eletrodo Au(111) em 0.1 mol L<sup>-1</sup> PB-Cit (pH 4.6) com 1 mg mL<sup>-1</sup> lacase e com adição de ABTS [0 - 20 μmol L<sup>-1</sup>], v = 5 mV.s<sup>-1</sup>; (b) Representação gráfica de |i<sup>c</sup> - i<sub>0</sub>| vs [ABTS]. ----- 68

**Figura 4.7** – Voltamogramas cíclicos do eletrodo Au(111)/CS<sub>2</sub>/NP20 com a adição de ABTS [0 - 20 μmol L<sup>-1</sup>], 0.1 mol L<sup>-1</sup> PB-Cit (pH 4.6) e v = 5 mV s<sup>-1</sup>. ----- 68

**Figura 4.8** – Voltamogramas cíclicos dos eletrodos: (a) Au(111)/CS<sub>2</sub>/Lacase, (b) Au(111)/CS<sub>2</sub>/NP20/Lacase e (c) Au(111)/CS<sub>2</sub>/NP60/Lacase com adição de ABTS [0 - 20 μmol L<sup>-1</sup>], em 0.1 mol L<sup>-1</sup> PB-Cit (pH 4.6) e v = 5 mV s<sup>-1</sup> ;(d) Representação gráfica de |i - i<sub>0</sub>| vs [ABTS]. ----- 70

**Figura 4.9** – Cronoamperogramas do eletrodo Au(111)/CS<sub>2</sub>/NP60, durante 600 s, a 0.41 V e em 0.1 mol L<sup>-1</sup> PB-Cit (pH 4.6) com a adição de ABTS [0 - 12 μmol L<sup>-1</sup>]. ----- 71

**Figura 4.10** - Cronoamperogramas dos eletrodos: (a) Au(111)/CS<sub>2</sub>/Lacase, (b) Au(111)/CS<sub>2</sub>/NP20/Lacase e (c) Au(111)/CS<sub>2</sub>/NP60/Lacase com a adição de ABTS [0 - 20  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ], durante 600 s em 0.1 mol L<sup>-1</sup> PB-Cit (pH 4.6);----- 72

**Figura 4.11** – Representação gráfica de  $|i - i_0|$  vs concentração de ABTS dos cronamperogramas da figura 4.10 ----- 73

**Figura 4.12** – Imagem de AFM da superfície do eletrodo de ouro modificado com lacase. (a) Au(111)/CS<sub>2</sub>/Lacase, (b) e (c) Au(111)/CS<sub>2</sub>/NP60/Lacase. (d) Análise de secção da figura (c) ----- 75

**Figura 4.13** – Espectros de UV-Vis: (a) Em solução (b) Dispersão com NPs (c) NP60+CS<sub>2</sub>+Lacase ----- 76

## Índice de tabelas

<b>Tabela 2.1</b> - Caraterística dos reagentes utilizados-----	15
<b>Tabela 2.2</b> – Reagentes e as suas proporções utilizadas na preparação dos diferentes elétrodo. -----	20
<b>Tabela 3.1</b> - Valores de potenciais ( $E_p$ ), recobrimento superficial ( $\Gamma$ ) e densidades de corrente dos picos ( $i_p$ ) das diferentes NPs quimicamente adsorvidas no Au(111) com $CS_2$ , obtidos a partir dos voltamograma cíclicos registados a $50\text{ mV s}^{-1}$ . -----	43
<b>Tabela 3.2</b> - Valores de potenciais de pico ( $E_p$ ), da densidade de corrente de oxidação ( $i_p$ ) e das quantidades adsorvidas ( $\Gamma$ ), obtidos a partir das figuras 3.17 (a) e (b), para um elétrodo de Au (111) modificado com epinefrina na presença e ausência de NP20.-----	52
<b>Tabela 3.3</b> - Valores de potenciais redox ( $E_p$ ) e da densidade de corrente dos picos ( $i_p$ ) atribuídos à epinefrina e às NP20 imobilizadas, obtidos a partir dos voltamogramas cíclicos (PBS $0.1\text{ mol L}^{-1}$ (pH 7) e $v = 50\text{ mV s}^{-1}$ ) apresentados nas figuras 3.6 e 3.17 (b). --	54
<b>Tabela 3.4</b> – Valores de potenciais redox ( $E_p$ ), da densidade de corrente ( $i_p$ ) e das quantidades adsorvidas ( $\Gamma$ ) da epinefrina em $H_2SO_4\ 0.05\text{ mol L}^{-1}$ e $v = 50\text{ mV s}^{-1}$ . -----	56
<b>Tabela 3.5</b> – Comprimento de onda dos picos ( $\lambda$ ) obtidos no espectros UV-Vis de cada amostra através dos -----	59
<b>Tabela 4.1</b> - Valores de comprimento de onda ( $\lambda$ ) dos picos detetados nos espectros de UV-Vis das várias amostras.-----	77

## Símbolos e abreviaturas

ABTS - Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)

AFM – (*Atomic Force Microscope*) Microscopia de força atômica

CH – (*Chitosan*) Quitosano

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DSP – (*dithio-bis(succinimidyl propionate)*)

DTC - Ditiocarbamato

Epf. - Epinefrina

GOX – Enzima glucose oxidase

HPLC – (*High-performance liquid chromatography*) Cromatografia líquida de alta definição

Lac. - Lacase

NPs – Nanopartículas de óxido de ferro

NP7 – Nanopartículas de óxido de ferro com tamanho médio de 7 nm

NP20 – Nanopartículas de óxido de ferro com tamanho médio de 20 nm

NP60 – Nanopartículas de óxido de ferro com tamanho médio e 60 nm

PBS ou PB – Tampão fosfato salino

PB-Cit – Tampão citrato-fosfato

SAMs – (*Self Assembled-Monolayers*) monocamadas auto-montadas

SCE – Eléttrodo saturado de calomelanos

STM – (*Scanning Tunneling Microscope*) Microscopia de efeito de túnel

TEM – (*Transmission Electron Microscopy*) Microscopia eletrônica de transmissão

UV – Ultravioleta

Vis – Visível

A – Área do eléttrodo ( $\text{cm}^2$ )

$\alpha$  – Absorvância

$\varepsilon$  - Coeficiente de extinção molar ( $\text{mol}^{-1} \text{L cm}^{-1}$ )

C – Concentração das espécies reduzidas ( $\text{mol. L}^{-1}$ )

c – Concentração da solução ( $\text{mol. L}^{-1}$ )

$\lambda$  - Comprimento de onda (nm)

$E_1$  – Potencial inicial e final  
 $E_2$  – Potencial de inversão  
 $E_p^c$  - Potencial de pico catódico (V)  
 $E_p^a$  - Potencial de pico anódico (V)  
 $E_{1/2}$  – Potencial de meia onda (V)  
 $\Delta E_p$  – Separação dos picos redox (V)  
 $F$  – Constante de Faraday ( $C\ mol^{-1}$ )  
 $I$  – Intensidade de corrente medida (A)  
 $I_c$  – Componente capacitiva da intensidade de corrente medida (A)  
 $I_f$  – Componente faradaica da intensidade de corrente medida (A)  
 $I_p^c$  – Intensidade de corrente do pico catódico (A)  
 $I_p^a$  – Intensidade de corrente do pico anódico (A)  
 $i_p$  – Densidade de corrente do pico ( $A\ cm^{-2}$ )  
 $i_p^c$  – Densidade de corrente do pico catódico ( $A\ cm^{-2}$ )  
 $i_p^a$  – Densidade de corrente do pico anódico ( $A\ cm^{-2}$ )  
 $i_{max}$  – Densidade de corrente do pico máximo ( $A\ cm^{-2}$ )  
 $l$  – Comprimento do caminho ótico (cm)  
 $n$  – Número de elétrons envolvidos na reação  
 $Q$  – Carga elétrica (C)  
 $R$  – Constante dos gases ideais ( $J\ K^{-1}\ mol^{-1}$ )  
 $T$  – Temperatura do sistema (K)  
 $t$  – Tempo (s)  
 $v$  – Velocidade de varrimento ( $mV\ s^{-1}$ )  
 $\Gamma$  - Recobrimento superficial ( $mol\ cm^{-2}$ )  
 $\Gamma^a$  – Recobrimento estimado pela integração do pico anódico ( $mol\ cm^{-2}$ )  
 $\Gamma^c$  – Recobrimento estimado pela integração do pico catódico ( $mol\ cm^{-2}$ )



## Índice

Agradecimentos .....	i
Resumo .....	iii
Abstract.....	v
Índice de figuras .....	vii
Índice de tabelas.....	xiii
Símbolos e abreviaturas .....	xiv

### Capítulo 1:

<b>Introdução .....</b>	<b>1</b>
1.1 Biossensores .....	3
1.2 Nanopartículas magnéticas de tipo magnetite .....	6
1.3 Modificação da superfície do transdutor.....	7
1.4 Motivação e objetivo .....	11

### Capítulo 2:

<b>Metodologia Experimental e Técnicas de Caracterização .....</b>	<b>13</b>
2.1 Metodologia experimental .....	15
2.1.1 Reagentes e Soluções .....	15
2.1.2 Célula e Eléttodos .....	16
2.1.3 Limpeza dos eléctrodos .....	17
2.1.4 Preparação dos eléctrodos modificados .....	17
2.2 Técnicas de Caracterização .....	21
2.2.1 Técnicas eletroquímicas .....	21

2.2.1.1 Voltametria cíclica -----	21
2.2.1.2 Cronoamperometria -----	24
2.2.1.3 Equipamento e detalhes experimentais -----	25
2.2.2 Microscopia de Força Atômica -----	27
2.2.2.1 Equipamento de AFM e preparação das amostras -----	30
2.2.3 Microscopia eletrônica de transmissão -----	30
2.2.4 Espectroscopia de UV-Visível -----	32
2.2.4.1 Aquisição de espectros -----	33

### **Capítulo 3:**

#### **Modificação de elétrodos de ouro com nanopartículas de óxido de ferro funcionalizadas** ----- **35**

3.1 Caracterização morfológica das nanopartículas de óxido de ferro -----	37
3.2 Caracterização eletroquímica das nanopartículas de óxido de ferro -----	39
3.2.1 Imobilização de nanopartículas de óxido de ferro via reação com CS <sub>2</sub> -----	40
3.2.2 Caracterização morfológica dos elétrodos de ouro modificados com CS <sub>2</sub> e nanopartículas de óxido de ferro -----	44
3.2.3 Imobilização covalente de nanopartículas em SAMs de ditiol -----	46
3.2.4 Adsorção física de nanopartículas na superfície do eletrodo de ouro -----	47
3.2 Imobilização de nanopartículas de óxido de ferro funcionalizadas com epinefrina por reação com CS <sub>2</sub> -----	48
3.3.1 Caracterização morfológica dos elétrodos de ouro modificados com CS <sub>2</sub> , nanopartículas de óxido de ferro e epinefrina -----	57
3.4 Caracterização por espectroscopia de UV-Vis de nanopartículas de óxido de ferro funcionalizadas -----	58



## **Capítulo 4:**

### **Eléttodos modificados com CS<sub>2</sub> e nanoprtículas de óxido de ferro para o desenvolvimento de biossensores enzimáticos----- 61**

#### **4.1 Estudos eletroquímicos----- 66**

##### **4.1.1 Caracterização morfológica dos elétroodos de ouro modificados com CS<sub>2</sub>, lacase e nanoprtículas de óxido de ferro----- 74**

#### **4.2 Caracterização por espectroscopia de UV-Vis de nanoprtículas de óxido de ferro funcionalizadas com lacase ----- 75**

## **Capítulo 5:**

### **Conclusão e perspectivas ----- 79**

### **Referências Bibliográficas ----- 85**







# **Capítulo 1:**

## Introdução



## 1.1 Biossensores

Os biossensores são dispositivos eletrônicos que, pela relevância da sua aplicabilidade, têm adquirido uma importância crescente, como é um exemplo disso o biossensor de glicose no sangue (figura 1.1) e, por isso, nos últimos anos foram investidos bilhões de dólares na sua pesquisa <sup>[1-2]</sup>.

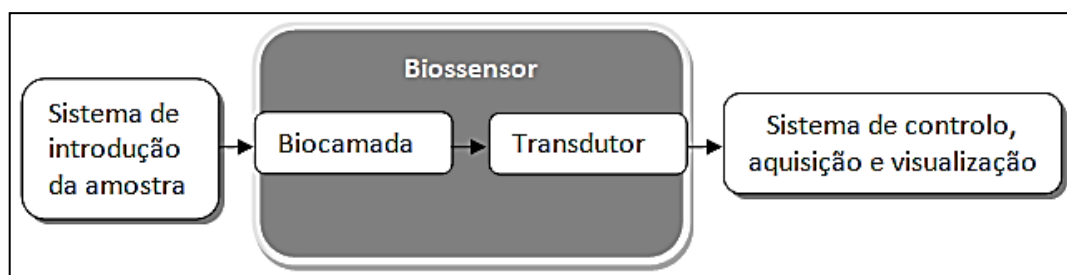


**Figura 1.1** - Biossensor para análise de glicose no sangue (*On-Call®*).

Os biossensores têm um papel fundamental como ferramenta analítica e tem sido desenvolvido muito trabalho no sentido de criar dispositivos com maior precisão, maior sensibilidade, não invasivos e energeticamente mais eficientes <sup>[1-2]</sup>. Os métodos de análise convencionais, como HPLC ou espectroscopia de massa, exigem preparação da amostra, tempo de processamento, adição de reagente e equipamentos caros, enquanto os biossensores são rápidos, sensíveis, seletivos, de baixo custo e de fácil uso <sup>[1-3]</sup>.

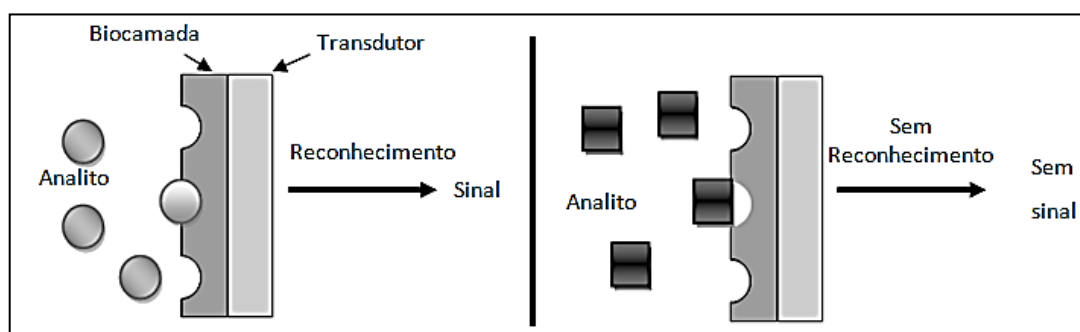
O objetivo destes dispositivos analíticos é produzir um sinal elétrico proveniente de uma alteração do sistema biológico que dará uma informação proporcional à concentração do analito <sup>[1-2]</sup>. O primeiro biossensor a ser fabricado foi desenvolvido em 1962 por Clark e Lyons, tendo estes autores utilizado, como elemento biológico, o enzima glucose oxidase para a detecção da glicose para controle de diabetes <sup>[4-6]</sup>.

Os biossensores são constituídos por um sistema de introdução da amostra, uma biocamada onde ocorre o reconhecimento do analito, um transdutor onde se converte o sinal biológico em sinal elétrico e uma unidade processadora do sinal, figura 1.2. Todos os biossensores se baseiam na mesma estrutura base de funcionamento <sup>[1,2,7,8]</sup>.



**Figura 1.2** - Estrutura esquemática de um biossensor.

De uma forma geral, a biocamada e o transdutor elétrico são as partes fundamentais de um biossensor. A biocamada é constituída pela componente biológica, o bioreceptor, que está imobilizada no eletrodo e irá promover o reconhecimento do analito quando estes entram em contato. Ao entrarem em contiguidade, caso haja uma reação de bioreconhecimento, ocorrem mudanças físico-químicas que irão proporcionar um sinal que será medido pelo transdutor elétrico (figura 1.3). O sinal decodificado pelo transdutor é por fim detetado e processado no sistema de controle, aquisição e visualização <sup>[1 - 4,8]</sup>.



**Figura 1.3** – Ilustração do reconhecimento do analito ao entrar em contato com a biocamada.

Existem vários tipos de biocamadas e de transdutores, sendo estes componentes essenciais para a classificação dos biossensores. Os bioreceptores podem ser enzimas, anticorpos, ácidos nucleicos, DNA, entre outras substâncias biológicas <sup>[1,2,4]</sup>. Nos últimos 40 anos, os biossensores enzimáticos têm sido os mais estudados <sup>[9]</sup>.

Os enzimas são biomoléculas presentes em todos os seres vivos, especializadas e específicas, com um poder catalítico extremamente elevado e dificilmente alcançado pelos catalisadores sintéticos. Estas proteínas, de estrutura tridimensional complexa, atuam de forma muito organizada e catalisam apenas um substrato, ou um número restrito estruturalmente similares. Esta especificidade deve-se à estrutura do seu centro ativo, possuindo uma geometria específica e determinadas características físico-químicas



como a hidrofobicidade e a carga elétrica local <sup>[10]</sup>. Por serem proteínas, a temperatura e o pH são fatores externos especialmente importantes que influenciam a velocidade da reação enzimática. Para uma dada reação, a velocidade é máxima para valores de pH e temperatura ótimos. Acima deste valor de temperatura ocorre desnaturação do enzima e, a temperaturas muito baixas, o enzima torna-se inativo. Tal como a temperatura, também existe um valor de pH ótimo. A este valor de pH, obtém-se o ponto isoelétrico cujas cargas das proteínas se encontram em equilíbrio. Deste modo, a distribuição de cargas elétricas da molécula da proteína e o centro catalítico é ideal para a catálise <sup>[10]</sup>.

O número de enzimas atualmente explorados em biossensores é elevado, sendo os mais utilizados pertencentes à classe de oxidoreduases. Esta classe compreende enzimas que catalisam reações de oxidação-redução, envolvendo processos de transferência de eletrões na conversão enzimática do reagente em produto <sup>[11-12]</sup>. Nos biossensores, os enzimas encontram-se imobilizados, sendo essa uma grande vantagem, já que quando o enzima se encontra em solução, este apresenta um comportamento disperso, instabilidade, rápida perda da atividade catalítica e não tem capacidade de regeneração <sup>[13]</sup>. Contudo, a imobilização de uma biomolécula numa superfície transdutora é um dos passos cruciais no desenvolvimento de biossensores pois apesar do enzima poder ser regenerado, a sua atividade biológica e estabilidade têm que ser mantidas após este processo <sup>[13-16]</sup>. Os métodos de imobilização são divididos em dois grandes grupos: métodos físicos e químicos. Os métodos físicos envolvem interações fracas (Van der Waals, dipolo-dipolo ou por ligações de hidrogénio) e apresentam uma menor alteração da estrutura e da função do enzima, enquanto que os métodos químicos envolvem ligações covalentes e são capazes de apresentar um efeito agressivo podendo diminuir a atividade do enzima, apesar de conferirem ao biossensor uma melhor estabilidade operacional <sup>[12,17-18]</sup>.

A escolha do tipo de imobilização baseia-se no elemento a analisar, no enzima e no transdutor. Na escolha do transdutor, tem que se ter em conta algumas considerações como as características físicas (área superficial, resistência), estabilidade e aspetos económicos (custo – benefício, impacto ambiental, equipamentos e reagentes requeridos). Tem de se atender ao facto de ter que ser adequado ao bioreceptor a ser imobilizado, e ainda ter capacidade de medir as alterações ocorridas, sendo estas

químicas, bioquímicas e /ou físicas, quando o bioreceptor se liga à substância a analisar [12,19].

Os transdutores mais utilizados em biossensores enzimáticos são os eletroquímicos (ex. amperométricos), sendo muitos usados na detecção de drogas, concentrações de glicose, entre outros. Os biossensores eletroquímicos baseiam-se essencialmente nas propriedades elétricas, consequentes de reações químicas que produzem ou consomem elétrons entre o analito e a biocamada<sup>[7]</sup>. Esta classe de biossensores é a mais utilizada no fabrico destes dispositivos devido às suas vantagens que são: instrumentação simples, sensíveis, confiáveis, estáveis, de resposta rápida e de baixo custo<sup>[12]</sup>.

A transferência eletrónica direta entre a proteína e o eléctrodo pode ser difícil de ocorrer porque a estrutura tridimensional da proteína pode dificultar a interação com o transdutor ou pelo facto da proteína poder sofrer desnaturação sobre a superfície<sup>[20-21]</sup>.

Nos últimos anos, o desenvolvimento na síntese de vários tipos de nanomateriais tem levado à produção de muito trabalho de investigação tendo em vista a sua aplicação em diversos dispositivos, nomeadamente biossensores. Alguns dos nanomateriais mais utilizados têm sido partículas metálicas, semicondutores, óxidos magnéticos e ainda nanomateriais baseados em carbono, como por exemplo nanotubos ou grafeno<sup>[22-25]</sup>.

## **1.2 Nanopartículas magnéticas de tipo magnetite**

Atualmente, as nanopartículas são muito utilizadas na produção de biossensores, essencialmente porque oferecem benefícios como a grande área superficial, promoção da transferência eletrónica e a fácil imobilização das proteínas, sendo as nanopartículas de ferro de tipo magnetite muito exploradas<sup>[25-27]</sup>. Este tipo de nanopartículas tem como maiores vantagens a sua baixa toxicidade, biocompatibilidade e ainda as suas propriedades magnéticas<sup>[28-30]</sup>. Apresentam também a habilidade de promover a transferência de elétrons entre os eléctrodos e o centro ativo dos enzima devido ao seu tamanho e às suas propriedades<sup>[27,31]</sup>. No entanto, a capacidade de imobilizar covalentemente proteínas na superfície das nanopartículas depende da ativação da ligação química entre proteínas e partículas<sup>[32]</sup>.

A magnetite,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , é um óxido magnético que exibe cor preta, boa condutividade elétrica e brilho metálico <sup>[33]</sup>. Este óxido apresenta uma estrutura que pertence ao grupo da espinela cuja fórmula geral é  $\text{AB}_2\text{O}_4$ , podendo ser genericamente descrito como  $(\text{Fe}^{2+})_{\text{tet}}(\text{Fe}^{3+})_{\text{oct}}(\text{Fe}^{3+})_{\text{tet}}(\text{O}^{2-})_4$ , onde tet e oct designam respetivamente os interstícios tetraédricos e octaédricos da estrutura <sup>[33-35]</sup>. A magnetite pode sofrer oxidação, sendo a sua forma oxidada vulgarmente designada como maghemite,  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ , apresentando a mesma estrutura do tipo espinela <sup>[33,35]</sup>. Composições intermédias entre uma e outra, são geralmente descritas como magnetite oxidada, e corretamente formuladas como  $\text{Fe}_{3-x}\text{O}_4$  <sup>[34]</sup>.

Assim, a utilização de nanopartículas de óxido de ferro modificadas tem como alvo o desenvolvimento de aparelhos mais económicos, específicos, estáveis e reprodutíveis <sup>[26]</sup>. São vários os artigos <sup>[25,27,29,30,32]</sup> em que utilizam nanopartículas de óxido de ferro para a preparação de biossensores de glicose. O quitosano, a sílica, nafion entre outros têm sido os suportes utilizados para a imobilização das nanopartículas <sup>[27,32]</sup>. Num dos casos <sup>[29]</sup>, onde as nanopartículas foram modificadas com quitosano e nafion, obteve-se um melhoramento do desempenho do biossensor de glicose na presença de nanopartículas de óxido de ferro uma vez que catalisam a reação de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Uma outra metodologia muito utilizada na preparação de biossensores nanoestruturadas é a modificação da superfície transdutora através da formação de monocamadas auto-montadas <sup>[36]</sup> que possam estabelecer a ligação entre o eletrodo e as nanopartículas funcionalizadas com biomoléculas.

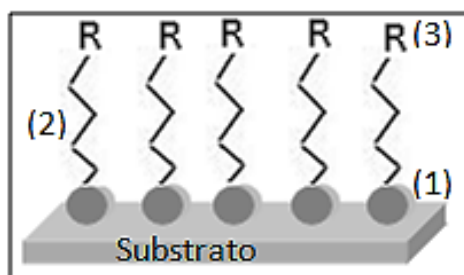
### 1.3 Modificação da superfície do transdutor

As monocamadas auto-montadas (*Self Assembled-Monolayers*, SAMs) apresentam um elevado potencial de aplicação no desenvolvimento de biossensores <sup>[36]</sup>. As SAMs manifestam elevada estabilidade, sensibilidade, reprodutibilidade e organização <sup>[36,37]</sup>. São constituídas por moléculas orgânicas que podem conter grupos terminais específicos com propriedades que podem ser modificadas e facilmente manipuladas dependendo da aplicação desejada.

O conceito geral da formação de SAMs envolve a ligação seletiva de moléculas numa superfície plana seguida de rearranjo periódico devido às forças intermoleculares entre

espécies adjacentes, ou seja, ocorre adsorção espontânea e uma auto-organização das moléculas orgânicas, sendo que grupos específicos formam uma ligação muito estável na superfície escolhida <sup>[37,38]</sup>.

As SAMs podem ser descritas como sendo constituídas por três partes específicas, grupo cabeça/âncora, cauda e grupo funcional tal como esquematicamente representado na figura 1.4 <sup>[39]</sup>:



**Figura 1.4** – Representação esquemática de uma monocamada auto-montada:  
(1) Grupo cabeça/âncora, (2) cauda e (3) grupo funcional.

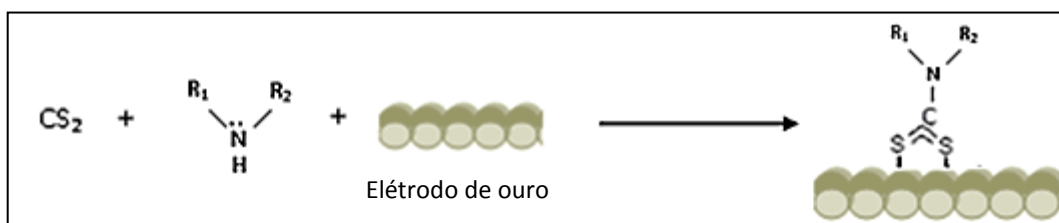
O grupo âncora é o grupo que se adsorve fortemente à superfície do eletrodo através de uma ligação química, que deverá ser muito forte, conferindo robustez à SAM <sup>[39]</sup>. Os compostos contendo enxofre e selênio apresentam uma forte afinidade com a superfície dos metais de transição, sendo que o enxofre se liga fortemente ao ouro (incluindo nanopartículas), prata, cobre, platina, ferro, entre outros <sup>[38]</sup>. A cauda é constituída por uma cadeia alquila, de dimensão variável, que estabelece ligações de van der Waals entre si. E por último, o grupo funcional é aquele que apresenta propriedades específicas como atividade redox, hidrofobicidade, e ainda facilidade de ligação a biomoléculas, entre outros.

São várias as superfícies utilizadas em SAMs, tais como os elementos citados anteriormente. Para decidir que tipo de eletrodo utilizar, deve-se ter em consideração alguns pontos importantes, tais como: aplicação da SAM, natureza química e orientação cristalográfica, qualidade do substrato (e.g. pureza, limpeza) e grupo âncora. Um dos sistemas de SAMs mais utilizados é a adsorção de derivados de enxofre em ouro, sendo a orientação cristalográfica (111), sem defeitos, aquela que permite o maior empacotamento de moléculas. Esta orientação cristalográfica do ouro pode ser conseguida através dum tratamento térmico, usualmente designado *flame-annealing*, <sup>[39]</sup> de uma superfície de uma camada fina de ouro depositada em vidro/mica.

Na modificação da superfície de elétrodos de Au(111), têm sido muito utilizadas moléculas organosulfúricas <sup>[38,40-42]</sup>, compostos orgânicos que contêm pelo menos uma ligação covalente carbono-enxofre, como os tióis, ditióis e dissulfureto de carbono. A forte afinidade entre o ouro e o enxofre permite obter uma monocamada muito estável e ordenada. De entre estes tipos de compostos, os ditióis são muito aplicados na conceção de biossensores <sup>[36]</sup>, nomeadamente quando se pretende ligar uma nanopartícula à superfície, uma vez que contêm dois enxofres terminais <sup>[43]</sup>. Assim, de forma a se conseguir obter a funcionalização adequada na preparação de um biossensor nanoestruturado, são necessários vários passos sequenciais, tais como: i) formação da SAM de ditiol, ii) ligação das nanopartículas, iii) utilização de um outro tiol contendo um grupo terminal amina ou ácido carboxílico; iv) ativação deste grupo com agentes acoplantes, e finalmente v) ligação covalente da biomoléculas através da formação de uma ligação peptídica <sup>[44]</sup>.

Nos últimos anos, os estudos com dissulfureto de carbono (CS<sub>2</sub>) têm vindo a ser cada vez mais explorados, uma vez que os resultados indicam que podem ser uma forte alternativa aos tióis. Estas moléculas manifestam propriedades de quimissorção, apresentando distâncias interatómicas S-S quase ideais para adsorção epitaxial em superfícies de Au(111) <sup>[45]</sup>.

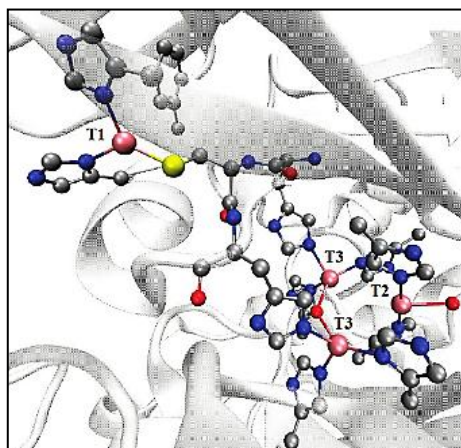
A maior distinção observada entre o uso de CS<sub>2</sub> e o ditiol na imobilização de enzimas, é que enquanto que usando ditiol são necessários passos intermédios, o CS<sub>2</sub> permite a formação de uma ligação estável com (bio)moléculas e com o elétrodo através de uma metodologia simples, num só passo, com a formação de ditiocarbamatos (DTC). Os DTCs formam-se espontaneamente por reação de grupos aminas e CS<sub>2</sub>; na presença de uma superfície de ouro o DTC formado adsorve-se espontaneamente <sup>[45-47]</sup> (figura 1.5).



**Figura 1.5** - Formação de ditiocarbamato num substrato de Au(111), na presença de uma amina e dissulfureto de carbono.

Neste trabalho, foram preparados DTCs através da reação entre o CS<sub>2</sub> e compostos contendo aminas, tais como uma catecolamina (epinefrina) e um enzima (lacase *Trametes Versicolor*). As catecolaminas são conhecidas como hormonas e neurotransmissores adrenérgicos provenientes da biossíntese do aminoácido tirosina <sup>[48]</sup>. As catecolaminas mais importantes são dopamina, noradrenalina e epinefrina. Enquanto que a dopamina e a noradrenalina apresentam uma amina primária, a epinefrina contém uma amina secundária na sua constituição.

A lacase (proveniente de *Trametes Versicolor*) é um enzima produzido por fungos e pertence à classe das oxidoreductases. Este enzima apresenta cor azul e o seu centro ativo possui quatro iões de cobre, classificados em três tipos (Figura 1.6) que desempenham diferentes papéis nos mecanismos catalíticos <sup>[49-51]</sup>.



**Figura 1.6** – Estrutura cristalina do enzima lacase (cobre do tipo T1, T2 e T3) <sup>[48]</sup>.

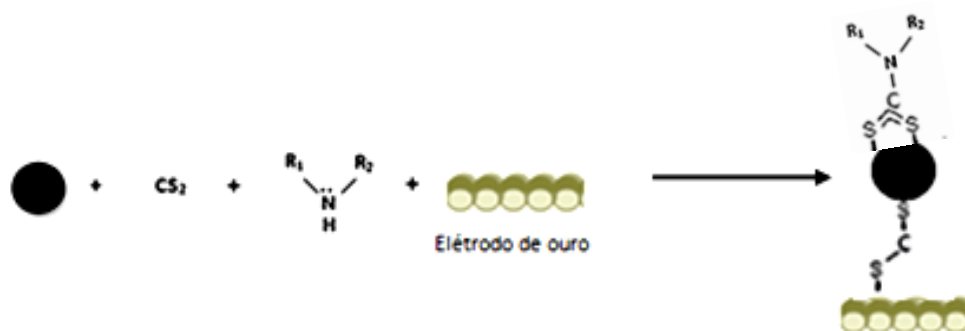
O cobre T1 está envolvido na oxidação do substrato, e os íões cobres de tipo T2 e T3 são os responsáveis pela redução do oxigénio molecular a água, sendo esta reação importante para a regeneração do enzima. O seu desempenho como biossensor depende da eficiência de imobilização, das condições de ensaio, e do tipo e número de enzimas imobilizados <sup>[49-52]</sup>. A lacase exibe uma especificidade extensa para diferentes substratos, e reduz mono-, di- e polifenóis e diaminas aromáticas. A especificidade da lacase para este tipo de compostos varia consoante a origem do enzima, tendo-se verificado que enzimas de diferentes fungos oxidam diferentes substratos <sup>[53-55]</sup>. Os compostos fenólicos têm sido muito estudados porque constituem um grande grupo de poluentes orgânicos que se encontram distribuídos pelo meio ambiente, apresentando efeitos como elevada

toxicidade, carcinogénicos e alergénicos. Devido aos seus efeitos devastos, é muito importante encontrar métodos que sejam rápidos e eficazes na medição deste tipo de compostos para que seja possível a sua remoção do meio ambiente.

Deste modo, a lacase tem vindo a ser estudada para o desenvolvimento de biossensores na determinação do teor de fenóis, pois além de serem seletivos para uma extensa variedade de substratos orgânicos, apresentam uma boa atividade enzimática.

## 1.4 Motivação e objetivo

Como referido anteriormente, as nanopartículas de óxido de ferro têm vindo a ganhar uma grande importância em diversas áreas devido à sua condutividade, área superficial e às suas propriedades magnéticas, o que motivou a sua aplicação em eléctrodos modificados para biossensores. Este trabalho teve assim como principal objetivo a (bio)funcionalização das nanopartículas de óxido de ferro com epinefrina e lacase, tendo em vista a sua aplicação como biossensores. Sabendo que os átomos de enxofre se ligam de uma forma estável a nanopartículas metálicas, testou-se pela primeira vez o CS<sub>2</sub> para estabelecer a ligação entre um eléctrodo de ouro (Au(111)) e as NPs. Uma vez que o CS<sub>2</sub> reage com grupos amina presente nas estruturas da lacase e da epinefrina, este composto também tem o papel de funcionalizar as NPs imobilizadas no ouro (figura 1.7). A epinefrina (usado como composto modelo) é utilizada como teste preliminar, de forma a verificar se é possível obter a sua imobilização através da formação de ditiocarbamato S<sub>2</sub>-C-N.



**Figura 1.7** - Metodologia utilizada para a modificação da superfície de ouro com CS<sub>2</sub>, nanopartículas de óxido de ferro e um composto contendo amina (epinefrina ou lacase).

Uma (bio)funcionalização das nanopartículas permitirá o desenvolvimento de uma plataforma para um biossensor através de uma metodologia de um só passo, num

elétrodo de Au(111). Assim, devido à sua afinidade, um dos átomos de enxofre do CS<sub>2</sub> ligar-se-á ao ouro e o outro às nanopartículas de óxido de ferro.



## **Capítulo 2:**

# **Metodologia Experimental e Técnicas de Caracterização**



## 2.1 Metodologia experimental

### 2.1.1 Reagentes e Soluções

Os reagentes utilizados neste trabalho experimental encontram-se listados na tabela 2.1.

**Tabela 2.1** - Característica dos reagentes utilizados

Compostos/Reagentes	Marca	Grau de Pureza %
Ácido Sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ )	Panreac	98 (p.a)
Ácido cítrico ( $\text{CH}_8\text{O}_7\cdot\text{H}_2\text{O}$ )	Sigma	99,5
Hidrogenofosfato de potássio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	Merck	98 (p.a)
Hidrogenofosfato de sódio monobásico ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ )	Merck	98 (p.a)
Hidrogenofosfato de sódio dibásico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	Merck	98 (p.a)
Cloreto de sódio ( $\text{NaCl}$ )	Merck	99 (p.a)
Cloreto de potássio ( $\text{KCl}$ )	Merck	99 (p.a)
Etanol absoluto ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ )	Riedel-de Haen	99 (p.a)
Dissulfureto de carbono ( $\text{CS}_2$ )	Acros Organics	≥ 99
1,6-Hexanoditiol ( $\text{HS}(\text{CH}_2)_6\text{SH}$ )	Alfa Aesar	97
Epinefrina ( $\text{C}_9\text{H}_{13}\text{NO}_3$ )	Sigma-Aldrich	≥ 95
ABTS ( $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_8\text{S}_4$ )	Sigma	
Lacase de <i>Trametes versicolor</i> (E.C. 1.10.3.2) <sup>1</sup>	Fluka	

Para a preparação dos elétrodos utilizaram-se soluções tampão fosfato salino e tampão citrato-fosfato. Todas as soluções foram preparadas, com água milipore Mili-Q A10 (18.2 MΩ cm a 25º C), da seguinte forma:

- Tampão fosfato salino (**PBS**) com concentração de 0.1 mol L<sup>-1</sup> em ião fosfato (pH 7):

Esta solução foi preparada com 8.0 mmol L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1.14 mmol L<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 138 mmol L<sup>-1</sup> NaCl e 2.7 mmol L<sup>-1</sup> KCl.

<sup>1</sup> Informação detalhada em anexo

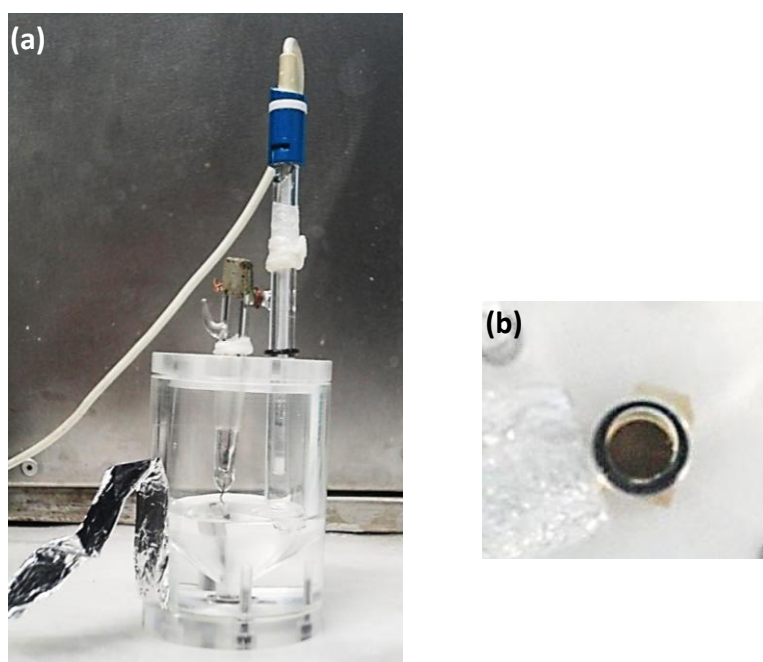
- Tampão citrato-fosfato (**PB-Cit**) com concentração de  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 4.6):

Para a preparação desta solução usou-se uma solução de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ( $0.1 \text{ mol L}^{-1}$ ) e de  $\text{CH}_3\text{O}_7\cdot\text{H}_2\text{O}$  ( $0.1 \text{ mol L}^{-1}$ ).

As soluções de  $\text{CS}_2$  foram preparadas com solução tampão PB-Cit ou PBS, sempre de forma a obter uma solução com concentração em  $\text{CS}_2$  de  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$ . De modo a evitar problemas de degradação, esta solução foi sempre preparada antes de cada utilização.

### 2.1.2 Célula e Elétrodos

Todos os ensaios foram efetuados utilizando uma célula eletroquímica de um só compartimento composta por três eletrodos: eletrodo de trabalho, eletrodo de referência e um contra-eletrodo (Figura 2.1).



**Figura 2.1 – (a)** Célula eletroquímica utilizada e **(b)** Eléttrodo de trabalho de Au (111).

No eletrodo de trabalho, figura 2.1 (b), ocorrem as reações envolvendo o analito. São tipicamente compostos por um material inerte, como a platina, ouro ou carbono. Apresentam uma interface polarizável, elevada condução elétrica, grau de pureza e reprodutibilidade da superfície <sup>[56]</sup>. Os eletrodos de trabalho utilizados foram placas de ouro com dimensões  $1.1 \times 1.1 \text{ cm}^2$  da marca Arrandee<sup>TM</sup>. Estas placas de ouro são

constituídas por uma camada de ouro de 200 nm evaporado em vidro borosilicato com uma camada intermédia de crómio (2-4 nm) para possibilitar a aderência do ouro ao vidro.

O eléctrodo de referência apresenta um potencial constante e conhecido em relação ao eléctrodo de trabalho, sendo insensível à composição da solução em estudo. Neste trabalho foi utilizado o eléctrodo saturado de calomelanos (SCE) como referência. Como contra-eléctrodo foi utilizado o eléctrodo de platina, que serve para completar o circuito eletroquímico, permitindo o fluxo de corrente entre os eléctrodos de trabalho e o de referência <sup>[56]</sup>.

### 2.1.3 Limpeza dos eléctrodos

As placas de ouro foram previamente limpas sendo este passo de extrema importância para uma boa adsorção das nanopartículas e moléculas testadas. Foram executados vários passos de forma a se obter uma boa limpeza. No primeiro, colocou-se a placa de ouro numa solução piranha (1:3 de  $H_2O_2$  e de  $H_2SO_4$ ) durante uns minutos sendo de seguida lavada com água millipore e etanol, e por fim, seca com azoto. De seguida, a placa foi sujeita a um tratamento térmico através de um aquecimento à chama (*flame-annealing*), de forma rápida e através de movimentos horizontais e verticais, sendo este processo repetido duas vezes até à incandescência. É através deste processo que o ouro adquire a orientação cristalográfica predominantemente (111), obtendo-se uma superfície plana que facilita a organização dos átomos de enxofre ao ouro. Por fim, depois do arrefecimento, colocou-se novamente a placa de ouro na solução piranha de forma a eliminar resíduos resultantes do *flame-annealing*, lavou-se com água millipore e etanol, e por fim, secou-se novamente com azoto.

### 2.1.4 Preparação dos eléctrodos modificados

As nanopartículas de óxido de ferro utilizadas foram sintetizadas através de métodos de co-precipitação e redução-precipitação <sup>[34]</sup>, e apresentam uma estrutura de tipo

magnetite, sendo globalmente descritas como  $\text{Fe}_{3-x}\text{O}_4$ . Para este trabalho utilizaram-se partículas com tamanhos médios de 7, 20 e 60 nm. As NPs de 7 nm foram sintetizadas através do método de redução-precipitação, enquanto as NPs de 20 e 60 nm foram sintetizadas pelo método de co-precipitação, seguido de tratamento hidrotérmico de 6 h a 150 °C e 24 h a 200 °C, respetivamente. Ao longo deste trabalho, de forma a simplificar a escrita, as nanopartículas passarão a ser referidas como NP7, NP20 e NP60.

O estudo eletroquímico das nanopartículas de óxido de ferro foi efetuado usando elétrodos preparados pelo método de *Drop Casting*, figura 2.2, que corresponde à situação em que as NPs se encontram fisicamente adsorvidas à superfície dos elétrodos. Preparou-se uma dispersão de NP20 em água millipore. Sobre a placa de ouro de Au(111), colocaram-se algumas gotas desta dispersão e o elétrodo foi assim deixado a secar ao ar de forma a que as NPs ficassem fisicamente adsorvidas à sua superfície.



**Figura 2.2** - Esquema representativo da metodologia utilizada para a modificação da superfície do Au(111) com as NPs fisicamente adsorvidas nos elétrodos.

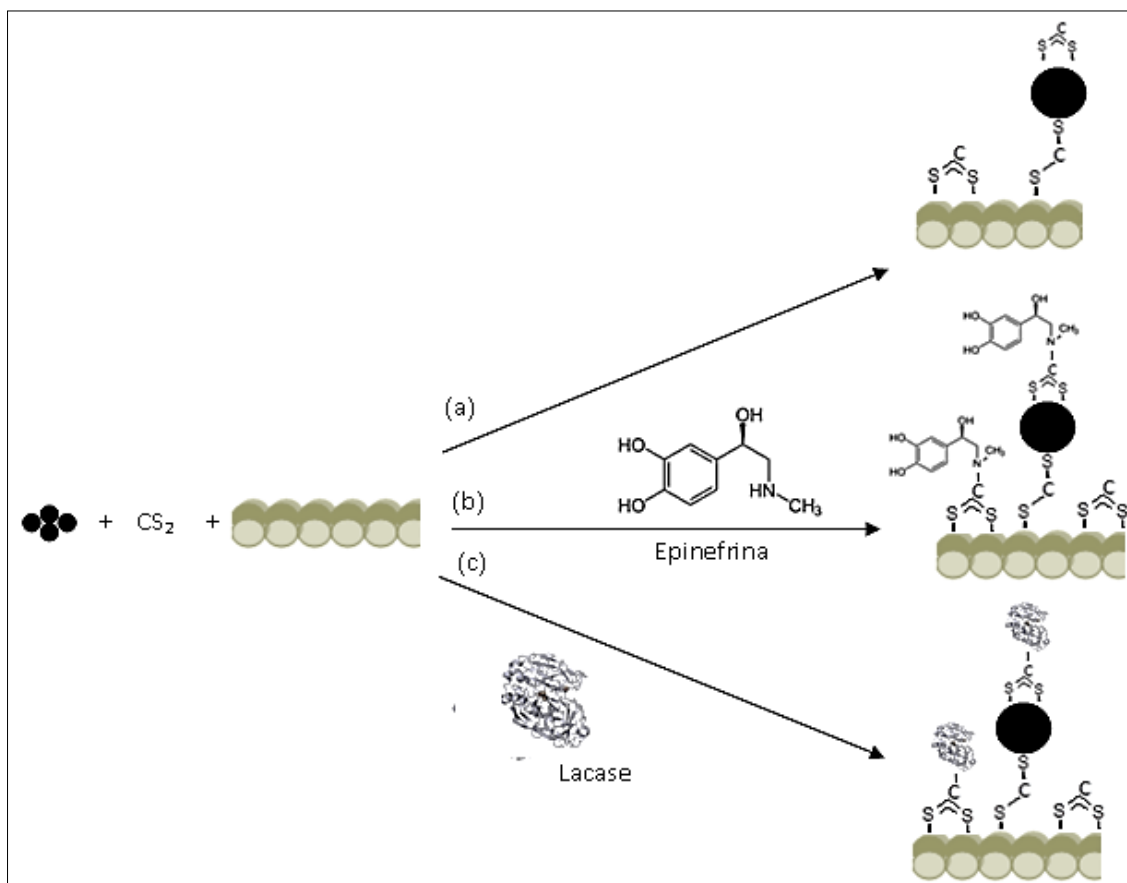
Realizou-se também um estudo de forma a verificar a viabilidade da adsorção química entre as nanopartículas de óxido de ferro e o elétrodo de ouro. Sabendo que o enxofre apresenta uma grande afinidade para o ouro e também para as nanopartículas de óxido de ferro, utilizou-se o  $\text{CS}_2$  de forma a se conseguir obter a ligação química pretendida, funcionando como grupo âncora. Deste modo, pretende-se o desenvolvimento de um elétrodo constituído por **Au(111)/ $\text{CS}_2$ /NPs**, tendo sido utilizadas as nanopartículas de 7, 20 e 60 nm.

Neste estudo, foram efetuados ensaios com o enzima lacase e a epinefrina, moléculas que contém aminas. Como foi referido anteriormente, o  $\text{CS}_2$  e a amina ligam-se formando o ditiocarbamato. Se a ligação entre o  $\text{CS}_2$  e as nanopartículas de óxido de ferro for exequível, ocorre a possibilidade de a epinefrina ou a lacase aderirem às NPs, obtendo um elétrodo final constituído por **Au(111)/ $\text{CS}_2$ /NPs/Epinefrina** e

**Au(111)/CS<sub>2</sub>/NPs/Lacase.** No estudo efetuado com a epinefrina, foram utilizadas as NPs de 7, 20 e 60 nm, enquanto com a lacase, utilizou-se apenas as NPs de 20 e 60 nm. As NP7 não foram utilizadas neste estudo porque o enzima lacase apresenta um tamanho semelhante a estas nanopartículas.

A preparação destes elétrodos foi realizada através da imersão das placas (após a sua limpeza), durante 16 - 18 h, numa dispersão contendo CS<sub>2</sub> e nanopartículas de óxido de ferro (7, 20 e 60 nm). Nos casos em que se utilizaram as (bio)moléculas, a dispersão também continha epinefrina ou lacase.

Assim, foram realizadas diferentes tipos de preparações, que se encontram esquematicamente representadas na figura 2.3:



**Figura 2.3** – Esquema representativo da metodologia usada para a modificação da superfície de ouro:

(a) Au(111)/CS<sub>2</sub>/NPs, (b) Au(111)/CS<sub>2</sub>/NPs /Epinefrina, (c) Au(111)/CS<sub>2</sub>/NPs /Lacase.

Para a preparação dos elétrodos com nanopartículas quimicamente ligadas, procedeu-se da seguinte forma:

Num gobelé de 5 mL, preparou-se uma dispersão com as NPs contendo 0.5 mL de solução tampão sendo esta dispersão deixada durante uns minutos no ultrassom. Ainda

no ultrassom, adicionou-se 1 mL da solução de CS<sub>2</sub> e por fim adicionou-se o eletrodo, para que as NPs ficassem quimicamente ligadas ao ouro.

No estudo realizado com a lacase (0.1 mg L<sup>-1</sup>) e a epinefrina (0.1 mol L<sup>-1</sup>), uns segundos após a adição do CS<sub>2</sub>, adicionam-se as (bio)moléculas e seguidamente a placa de ouro limpa.

Para finalizar, o gobelé foi coberto com papel de alumínio, sendo colocado no escuro. As placas de ouro que continham o enzima lacase foram colocadas a baixas temperaturas, 4 °C, e os restantes eletrodos, sem lacase, à temperatura ambiente. Após 16 - 18 h, as placas foram lavadas com água de forma a garantir que os produtos que ficam no eletrodo estivessem quimicamente adsorvidos, e os eletrodos assim obtidos foram secos com azoto.

Na tabela 2.2, apresenta-se detalhadamente as soluções e os compostos utilizados para as preparações dos eletrodos modificados nas diferentes experiências, sendo que cada símbolo refere-se a um diferente tipo de estudo.

**Tabela 2.2** – Reagentes e as suas proporções utilizadas na preparação dos diferentes eletrodos.

	Solução CS <sub>2</sub> V = 1 mL		Tampão V = 0.5 mL		Epinefrina m = 0.033 g	Lacase m = 1.5 mg
	PBS	PB-Cit	PBS	PB-Cit		
<b>Au(111)/CS<sub>2</sub>/NP</b>	•	◆	•	◆	-	-
<b>Au(111)/CS<sub>2</sub>/NP/Epf.</b>	□	-	□	-	□	-
<b>Au(111)/CS<sub>2</sub>/NPs/Lac.</b>	-	⊗	-	⊗	-	⊗

No caso da preparação dos eletrodos **Au(111)/CS<sub>2</sub>/NPs**, foram sempre utilizadas massas de nanopartículas entre 5 e 5.5 mg. Nos restantes eletrodos, (com epinefrina ou com lacase), foi necessário reduzir a quantidade de NPs utilizadas, e todos os estudos referidos dizem respeito a massas entre 0.5 e 1 mg. Foi utilizada uma menor quantidade



de massa porque, depois de vários estudos, verificou-se que se obtém melhores resultados.

## **2.2 Técnicas de Caracterização**

Neste trabalho utilizaram-se técnicas eletroquímicas, microscópicas e espectroscópicas para a caracterização das nanopartículas de óxido de ferro e dos elétrodos de ouro modificados.

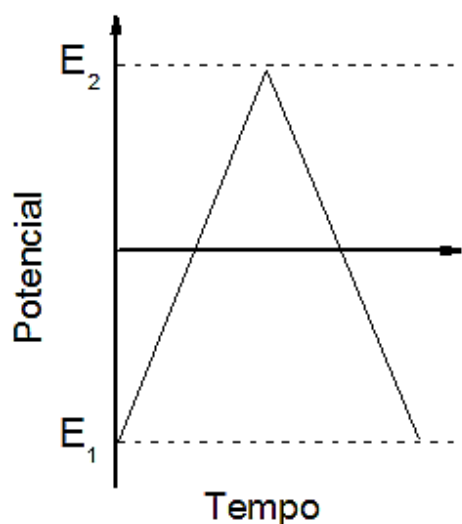
### **2.2.1 Técnicas eletroquímicas**

As técnicas eletroquímicas utilizadas neste trabalho foram a voltametria cíclica e a cronoamperometria.

#### ***2.2.1.1 Voltametria cíclica***

A voltametria cíclica consiste em medidas de corrente em função do potencial numa dada célula eletroquímica, onde está inserido o eletrodo de trabalho, alvo do estudo. Esta técnica fornece variados tipos de informação sobre o analito, como por exemplo os potenciais redox de espécies presentes e detecção de intermediários, no caso de reações reversíveis <sup>[57-60]</sup>.

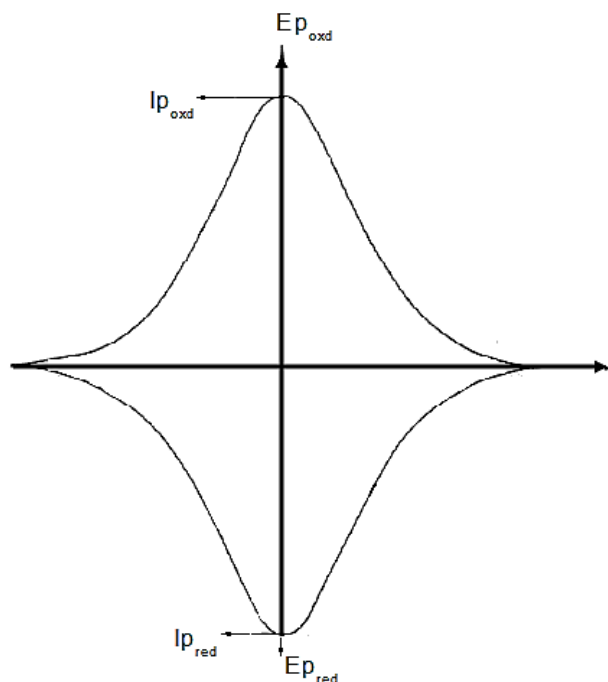
Para a realização destes ensaios, parte-se de um potencial  $E_1$  para um potencial  $E_2$ , onde ocorre uma inversão do potencial, finalizando o ciclo no potencial  $E_1$  (figura 2.4). Em cada ensaio são previamente escolhidos os parâmetros experimentais: potencial inicial e final, potencial de inversão, direção do varrimento e velocidade de varrimento ( $v$ ) <sup>[57]</sup>.



**Figura 2.4** - Voltamograma cíclico de um processo redox reversível de uma espécie adsorvida à superfície do eletrodo.

Num ensaio onde ocorre um processo redox, obtém-se dois ramos, um referente ao processo de oxidação e outro ao processo de redução. Deste modo, ocorre oxidação das espécies quando o varrimento é feito do potencial mais negativo para regiões mais positivas ( $E_1 \rightarrow E_2$ ) e ocorre redução quando o varrimento é feito de regiões mais positivas para mais negativas ( $E_2 \rightarrow E_1$ ), obtendo-se, deste modo, um voltamograma cíclico.

No caso específico de estudos envolvendo eletrodos modificados, a voltametria cíclica tem por objetivo comprovar a imobilização das espécies, quantificando sempre que possível, e também avaliar o seu comportamento eletroquímico na superfície <sup>[61]</sup>. A figura 2.5 traduz um voltamograma cíclico cujas espécies se encontram adsorvidas no eletrodo de trabalho. Através desta figura, é possível observar que se obtém um processo anódico, que se traduz como pico de oxidação com correntes positivas, e um processo catódico, pico de redução com correntes negativas. Do voltamograma cíclico podem-se extrair parâmetros importantes, tais como: potencial de pico catódico ( $E_p^c$ ) e anódico ( $E_p^a$ ), potencial formal, ( $E_{1/2} = (E_p^a + E_p^c)/2$ ), intensidade de corrente do pico catódico ( $I_p^c$ ) e anódico ( $I_p^a$ ). Estas grandezas dão informação sobre o processo de transferência eletrônica e sobre a organização das espécies eletroativas imobilizadas <sup>[62]</sup>.



**Figura 2.5** - Voltamograma cíclico de um processo redox reversível de uma espécie adsorvida à superfície do eletrodo.

Quando o eletrodo apresenta espécies adsorvidas, o processo redox não é controlado por transferência de massa, ou seja, como não ocorre difusão das espécies por estarem adsorvidas no eletrodo, a transferência eletrônica é rápida e, os picos são simétricos, logo  $\Delta E_p \approx 0 \text{ mV}$  [62].

Como foi referido anteriormente, um dos parâmetros extraídos dos voltamogramas é a intensidade de corrente dos picos catódicos e anódicos. A intensidade de corrente medida apresenta duas componentes: a componente faradaica,  $I_F$ , que está relacionada com a reação de transferência eletrônica, e a componente capacitiva,  $I_C$ , que contribui para a carga da dupla camada ( $I = I_C + I_F$ ).

Da razão entre a intensidade de corrente medida e a área do eletrodo de trabalho utilizada obtém-se a densidade de corrente do pico,  $i_p$ .

$$i_p = \frac{I}{A} \quad (\text{eq. 2.1})$$

A densidade de corrente dos processos redox para as espécies adsorvidas é dada pela equação 2.2:

$$i_p = \frac{n^2 F^2 A \Gamma}{4RT} \quad (\text{eq. 2.2})$$

Se as espécies se encontram adsorvidas no eletrodo, a densidade de corrente do pico é proporcional à velocidade de varrimento,  $i_p \propto \nu$ , e  $i_p = dQ/dt$ . Deste modo pode-se simplificar a equação 2.2, obtendo-se:

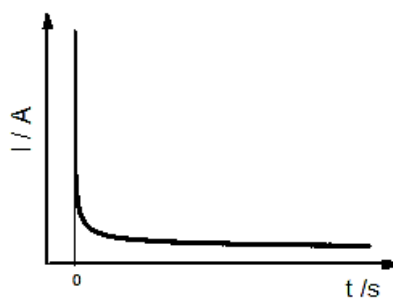
$$\Gamma = \frac{Q}{nFA} \quad (\text{eq. 2.3})$$

onde  $\Gamma$  é o recobrimento superficial ( $\text{mol cm}^{-2}$ ),  $A$  é a área do eletrodo ( $\text{cm}^2$ ),  $n$  é o número de elétrons envolvidos na reação,  $F$  é a constante de Faraday ( $\text{C mol}^{-1}$ ),  $R$  é a constante dos gases ideais ( $\text{J K}^{-1} \text{mol}^{-1}$ ),  $T$  é a temperatura do sistema (K) e  $Q$  é a carga elétrica (C).

A partir da equação 2.3, tendo em conta o número de elétrons envolvidos na reação redox, pode-se calcular a quantidade de espécies oxidadas e reduzidas em cada experiência. Estes cálculos resultam da integração da área do pico, procedimento este que, neste trabalho, foi efetuado com o programa *Origin*. Inicialmente define-se uma linha de base na área do pico que irá limitar a integração à área correspondente ao processo faradaico, ao qual corresponde uma dada carga elétrica. Desta forma, é possível calcular o recobrimento superficial.

### **2.2.1.2 Cronoamperometria**

A cronoamperometria é uma técnica em que se aplica um potencial constante ao eletrodo de trabalho, medindo-se a intensidade de corrente em função do tempo (figura 2.6), sendo que neste caso, a corrente obtida resulta do gradiente de concentração das espécies reduzidas na superfície do eletrodo de trabalho.



**Figura 2.6** – Variação típica da corrente em função do tempo na técnica de cronoamperometria.

A corrente resultante designa-se por corrente faradaica e, para um elétrodo planar, é expressa pela equação de Cottrell (eq. 2.4).

$$i = nFACD^{1/2} \pi^{1/2} t^{-1/2} \quad (\text{eq. 2.4})$$

onde  $i$  é a intensidade de corrente medida,  $n$  é o número de eletrões,  $F$  é a constante de Faraday ( $\text{C mol}^{-1}$ ),  $A$  é a área do elétrodo ( $\text{cm}^2$ ),  $C$  é a concentração das espécies reduzidas ( $\text{mol L}^{-1}$ ),  $t$  é o tempo (s) e  $D$  é o coeficiente de difusão das espécies oxidadas.

A cronoamperometria foi utilizada neste trabalho para estudar a atividade catalítica da lacase na presença do substrato ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS). O ABTS é adicionado a diferentes volumes no eletrólito. Este substrato será oxidado pelo enzima, e posteriormente irá ser reduzido na superfície do elétrodo de trabalho (Au(111)).

### **2.2.1.3 Equipamento e detalhes experimentais**

Nas técnicas de caracterização eletroquímicas foi utilizado um potencióstato (CHI Electrochemical Analyser - 600A) acoplado a um PC com o programa da CHI e uma caixa de Faraday (figura 2.7). Para cada experiência foram previamente escolhidos os parâmetros experimentais.



**Figura 2.7** - Instrumentação utilizada nos estudos eletroquímicos: potenciômetro, caixa de Faraday e computador.

Nos estudos de voltametria cíclica dos eletrodos preparados por *Drop casting* utilizou-se como eletrólito uma solução  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  PBS ou  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  PB-Cit, uma velocidade de varrimento de  $50 \text{ mV s}^{-1}$  e uma gama de potencial entre  $-0.6$  e  $1.0 \text{ V}$ . Nestas experiências o eletrólito foi borbulhado com azoto durante 5 minutos.

Os estudos referentes aos eletrodos **Au(111)/CS<sub>2</sub>/NPs**, foram realizados em diferentes eletrólitos:  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  PBS ou  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  PB-Cit. As experiências foram realizadas com velocidades de varrimento entre  $5$  e  $300 \text{ mV s}^{-1}$ . Os potenciais inicial e final foram sempre  $0 \text{ V}$ ; o potencial de inversão foi escolhido em função da velocidade de varrimento, sendo que quanto maior a velocidade de varrimento, maior o potencial utilizado.

Nos eletrodos **Au(111)/CS<sub>2</sub>/NPs/Epinefrina**, efetuaram-se experiências com velocidade de varrimento entre  $5$  e  $300 \text{ mV s}^{-1}$  e diferentes gamas de potenciais consoante o eletrólito utilizado. A escolha do potencial de inversão dependeu do pH do eletrólito, sendo que quanto mais baixo o pH, maior o potencial utilizado.

Nos estudos por voltametria cíclica dos eletrodos **Au(111)/CS<sub>2</sub>/NPs/Lacase**, foi utilizado como eletrólito o PB-Cit (pH 4.6) porque o enzima tem maior atividade para o substrato a este pH <sup>[63-65]</sup>. Neste caso, os potenciais inicial e final utilizados foram  $0,6 \text{ V}$ , e o potencial de inversão foi sempre  $0 \text{ V}$ .

A técnica de cronoamperometria foi utilizada para estudar a atividade catalítica da lacase através da adição do substrato ABTS com diferentes concentrações, utilizando como eletrólito suporte o tampão PB-Cit. O potencial constante aplicado foi  $0.41 \text{ V}$ , durante  $600 \text{ s}$ , pois este é valor de potencial onde se deteta a redução do ABTS.

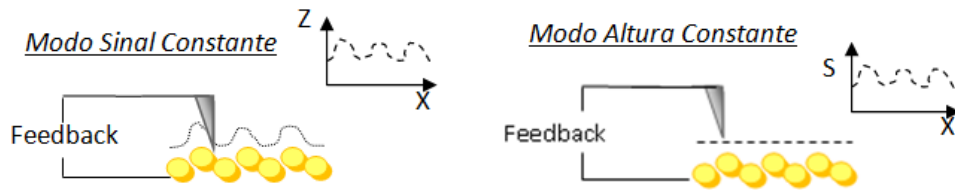
### 2.2.2 Microscopia de Força Atômica

A microscopia de varrimento de sonda (*Scanning Probe Microscopy*, SPM) compreende técnicas muito sensíveis, que através de varrimentos sucessivos de uma sonda, geralmente muito aguçada, sobre a superfície de uma amostra criam imagens que traduzem as interações sonda/amostra, e logo o relevo da superfície. A microscopia de varrimento de sonda divide-se em dois grandes grupos: microscopia de efeito de tunel (*Scanning Tunneling Microscopy*, STM) e de força atômica (*Atomic Force Microscopy*, AFM) <sup>[66,67]</sup>.

O STM foi desenvolvido em 1982 e permite estudar as forças entre átomos e observar as estruturas em escala atômica, em amostras condutoras ou semi-condutoras, o que restringe o número de amostras na qual a técnica pode ser empregue <sup>[66]</sup>.

O AFM pode ser aplicado a materiais condutores e não condutores, tornando-se deste modo mais vantajoso que o STM. As imagens de AFM são essencialmente baseadas por uma leitura física da superfície, resultantes da interação das forças entre a amostra e a sonda (e.g. van der Waals e forças interatômicas). Para análise morfológica e estrutural de materiais, o AFM apresenta uma resolução elevada, imagem tridimensional, não requer métodos específicos para a preparação da amostra e permite medir propriedades do material (e.g. rugosidade, espessura, diferenciação de propriedades mecânicas ou químicas) <sup>[66-68]</sup>.

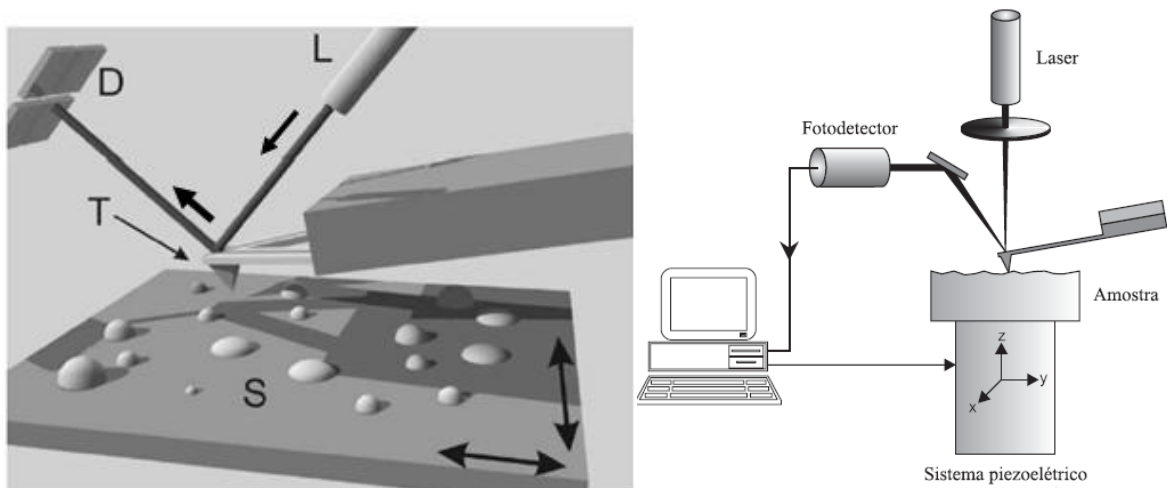
Neste tipo de microscópio as imagens são geradas através da medição das forças de atração ou repulsão entre a superfície da amostra e da sonda que varre a amostra. Este varrimento é feito recorrendo a um sistema piezoelétrico, com deslocamento nas posições x, y e z. O deslocamento é controlado por um circuito de retroação cuja função é manter o sinal ou altura constante (figura 2.8). O modo sinal constante é o mais usado pois evita danos nas pontas. Neste caso a distância entre a ponta e a amostra é mantida constante, por recurso ao sistema de retroação que ajusta continuamente a posição da ponta (deslocamentos no eixo do z) relativamente à amostra. Quando se utiliza o modo de altura constante, a posição vertical absoluta da ponta é mantida constante e o sinal que se mede reflete a topografia da amostra; as superfícies a medir por este modo têm que ser muito planas <sup>[68]</sup>.



**Figura 2.8** - Esquema representativo dos modos de operação em SPM (figura adaptada <sup>[69]</sup>).

O funcionamento deste microscópio baseia-se no uso de uma ponta muito afiada (geralmente de silício ou nitreto de silício) montada na extremidade de um *cantilever* (de silício, que funciona como alavanca), o qual está comumente ligado a um tubo de material piezoelétrico ("scanner"), capaz de controlar com muito rigor a posição tridimensional da ponta. As pontas são muito importantes porque interagem com o material sendo que quanto mais aguçadas forem, melhor será a resolução das imagens. O *cantilever* é sensível a pequenas variações de forças, sendo estas na ordem de  $10^{-12}$  N, sofrendo deflexão ao varrer a amostra.

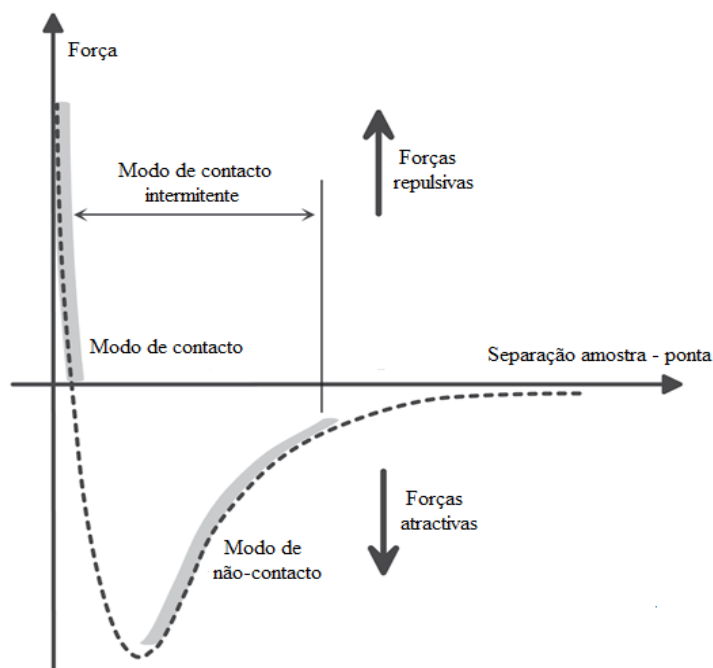
A figura 2.9 mostra um microscópio de AFM invertido, onde o substrato (S) é movido pelos cristais piezoelétricos e simultaneamente a sonda deteta a topografia da amostra. A detecção da deflexão do *cantilever* é ótica, sendo efetuada pela reflexão de um feixe de laser que incide na extremidade do *cantilever* (T) e é projetado num fotodíodo, tendo em conta as interações entre a ponta e a amostra. O fotodíodo é um detetor que produz um sinal elétrico e é através da análise deste sinal que se obtém a topografia da amostra <sup>[66]</sup>.



**Figura 2.9** - Esquematização do funcionamento de um microscópio de força atômica (figura adaptada <sup>[66]</sup>).



A técnica de microscopia de força atômica em geral apresenta três regimes de interação: contacto, intermitente (ou *tapping*) e não contacto como ilustrado na figura 2.10, que relaciona as forças (atrativas ou repulsivas) geradas pela interação amostra - ponta com os diferentes modos de operação. De acordo com o tipo de amostra presente, ou objetivo de uma experiência, podem ser usados diferentes modos de operação.



**Figura 2.10** – Gráfico ilustrativo das forças estabelecidas entre a amostra e a ponta num estudo por AFM, em função da distância que as separa, evidenciando as regiões correspondentes aos modos operativos (figura adaptado de <sup>[70]</sup>).

No modo contacto a ponta varre a amostra mantendo a menor distância possível, sendo as forças de repulsão envolvidas neste processo. O modo não contacto utiliza uma ponta oscilante que varre a amostra a uma dada distância, e é sensível a forças de longo alcance (e.g. van der Waals, eletrostáticas e força de dipolo magnético). Neste trabalho foi utilizado o modo *tapping* que é um regime intermédio entre o contacto e não contacto. Em modo de contacto intermitente, a sonda oscila a uma frequência próxima da sua frequência de ressonância, tocando na amostra após um ciclo de oscilação. Quando a ponta se aproxima da superfície a amplitude de oscilação é restringida, e esta informação é lida no fotodíodo, sendo a distância entre a ponta e amostra corrigida pelo sistema de retroação.

### 2.2.2.1 Equipamento de AFM e preparação das amostras

A caracterização morfológica da superfície dos elétrodos modificados foi realizada à temperatura ambiente, num microscópio de força atômica, multimode AFM acoplado a um controlador nanoscope IIIa (*Digital Instruments, Veeco*), (Figura 2.11). As imagens foram obtidas *ex-situ* em modo AFM de contacto intermitente (*Tapping*) com pontas de silício (Si), com uma frequência de oscilação de ca. 300 kHz. A superfície analisada foi varrida a uma velocidade de varrimento de ca. 1,5 Hz.



**Figura 2.11** – Imagem do microscópio de força atômica utilizado neste trabalho.

Na preparação das amostras de nanopartículas (NP7, NP20 e NP60), estas foram colocadas sobre uma mica, após a sua dispersão em água Millipore num ultrassom. Colocou-se uma gota da dispersão sobre a mica e deixada a secar ao ar. A morfologia dos elétrodos modificados contendo NP60, CS<sub>2</sub>, epinefrina ou lacase quimicamente adsorvidas no ouro também foi analisada por AFM.

### 2.2.3 Microscopia eletrónica de transmissão

A microscopia eletrónica de transmissão (*Transmission Electron Microscopy, TEM*) é uma técnica de microscopia na qual um feixe de eletrões é emitido em direção a uma amostra, interagindo com a amostra enquanto a atravessa. Em consequência dessa interação, obtém-se uma imagem que é ampliada, focada, e gravada com equipamento complementar<sup>[71-72]</sup>.

O microscópio de transmissão é constituído por um canhão que tem a capacidade de criar um feixe de eletrões altamente energético para a coluna do microscópio. O microscópio possui vários componentes que permitem a focagem do feixe de eletrões sobre a superfície da amostra, e a formação de uma imagem a partir da interação feixe-amostra.

As amostras a serem analisadas devem conter uma espessura fina ( $< 100$  nm), e de uma forma simplista, pode-se dizer que a imagem de nanopartículas adquirida através do microscópio de transmissão, corresponde à projeção da sua superfície.

No caso de estudos com nanopartículas, as imagens obtidas por microscopia eletrónica de transmissão permitem facilmente determinar o tamanho médio das nanopartículas.

As imagens das nanopartículas utilizadas neste trabalho foram obtidas num microscópio eletrónico de transmissão (Hitachi 8100), equipado com aquisição de imagem digital, pertencente ao Laboratório de Microscopia Eletrónica do Instituto de Ciência e Engenharia de Materiais e Superfícies (ICEMS) (figura 2.12).



**Figura 2.12** - Microscópio eletrónico de transmissão.

Para a realização destes ensaios, as nanopartículas NP7, NP20 e NP60 foram dispersas em água Millipore, sendo depois colocada uma gota desta dispersão sobre uma grelha de cobre adequada ao microscópio. As amostras foram analisadas em modo de aquisição de serviços.

## 2.2.4 Espectroscopia de UV-Visível

Neste trabalho foi utilizada a espectroscopia de UV-Visível tendo em vista a identificação de grupos funcionais. Foram estudadas soluções e dispersões contendo nanopartículas modificadas, tendo como propósito, em ambos os casos, observar os picos que permitem identificar o CS<sub>2</sub>, a lacase, a epinefrina e a formação do ditiocarbamato. Este estudo teve como principal objetivo averiguar a efetiva modificação das nanopartículas com os compostos atrás referidos (CS<sub>2</sub>, lacase, epinefrina).

A espectroscopia visível (Vis) e ultravioleta (UV) é um dos métodos analíticos mais usados em diversas áreas. A região ultravioleta do espectro é geralmente considerada na faixa de comprimento de onda de 200 a 400 nm e a região do visível entre 400 a 800 nm. Esta gama de comprimento de onda corresponde a valores de energia semelhantes à diferença entre estados eletrônicos de muitas moléculas. Assim, a absorção da radiação UV ou Vis excita os elétrons da molécula, dando origem às chamadas transições eletrônicas. Nestas transições, os elétrons de valência são promovidos do seu estado fundamental para estados de mais alta energia, estados excitados [73-74].

Quando o feixe de luz monocromático atravessa a amostra, parte da luz é absorvida pela solução e a restante é transmitida. A absorção de luz depende basicamente da concentração das moléculas absorventes e do caminho óptico. A Lei de Lambert-Beer relaciona a quantidade de luz que é absorvida pela amostra através do feixe de luz monocromático para um dado valor de comprimento de onda.

$$\log\left(\frac{I_0}{I_t}\right) = \varepsilon \cdot c \cdot l = a \quad (\text{eq. 2.5})$$

Nesta equação,  $l$  representa o comprimento do caminho ótico,  $c$  a concentração da solução,  $\varepsilon$  o coeficiente de extinção molar e  $a$  é a absorvância.

As bandas de absorção, características de cada composto, são caracterizadas por dois parâmetros fundamentais: a posição e a intensidade. A posição corresponde normalmente ao comprimento de onda ( $\lambda$ ) da radiação eletromagnética responsável pela transição eletrônica e, a intensidade depende da energia das orbitais moleculares e probabilidade de transição.

### **2.2.4.1 Aquisição de espectros**

Todos os ensaios de espectroscopia de UV-Vis foram realizados num Espectrofotômetro Jasco V560, utilizando células de quartzo como suporte das soluções e das dispersões. As experiências foram realizadas num intervalo de comprimento de onda entre 200 e 900 nm.

Para a execução destes ensaios, foram preparadas diversas soluções e dispersões.

Inicialmente, e de forma a se obter os picos de identificação do CS<sub>2</sub>, lacase, epinefrina e de ditiocarbamato formado pela reação entre o CS<sub>2</sub> e a amina da epinefrina ou da lacase, foram analisadas soluções sem a presença de nanopartículas.

As amostras que não continham a lacase foram preparadas com tampão PBS e no estudo das amostras que envolviam este enzima foi utilizado PB-Cit, usando-se como referências os respectivos tampões.

As soluções sem nanopartículas preparadas foram as seguintes:

**Amostra 1:** solução de CS<sub>2</sub> com concentração 0.1 mol L<sup>-1</sup>.

**Amostra 2:** solução de epinefrina com concentração 0.5 mmol L<sup>-1</sup>.

**Amostra 3:** solução de lacase com concentração 1 mg L<sup>-1</sup>.

**Amostra 4:** solução de CS<sub>2</sub> e epinefrina equimolar com concentração 0.5 mmol L<sup>-1</sup>.

**Amostra 5:** solução de CS<sub>2</sub> com concentração 0.1 mol L<sup>-1</sup> e lacase com concentração 0.1 mg L<sup>-1</sup>.

Após a preparação das amostras 4 e 5 em eppendorfs, foram levadas ao ultrassom durante uns segundos e foram deixadas a reagir durante 4 h à temperatura ambiente.

As dispersões preparadas foram as seguintes:

**Amostra 6:** NP60 em água Millipore.

**Amostra 7:** NP60 em 0.1 mol L<sup>-1</sup> de CS<sub>2</sub>.

**Amostra 8:** NP60 em 0.1 mol L<sup>-1</sup> de CS<sub>2</sub> e em 0.1 mol L<sup>-1</sup> de epinefrina.

**Amostra 9:** NP60 em 0.1 mol L<sup>-1</sup> de CS<sub>2</sub> e em 0.1 mg L<sup>-1</sup> de lacase.

No estudo das dispersões, que envolvem as nanopartículas de óxido de ferro (NP60), pretendia-se verificar se as nanopartículas tinham sido modificadas com CS<sub>2</sub> e, em caso positivo, verificar a ligação entre o CS<sub>2</sub> e a amina da epinefrina ou da lacase, através da formação de ditiocarbamato.

As dispersões foram efetuadas usando cerca de 1 mg de NP60, e levadas ao ultrassom durante uns segundos e, no caso das amostras 8 e 9 deixadas a reagir durante 4 h à temperatura ambiente, sendo que a amostra que continha lacase, foi colocada a baixas temperaturas, 4 °C. No final das 4h, com a ajuda de um íman, as amostras foram lavadas com água Millipore num total de vinte e cinco vezes, de forma a garantir que apenas as espécies quimicamente ligadas às nanopartículas estivessem presentes, sendo as restantes eliminadas nos processos de lavagem.

Na aquisição dos espectros, no caso das soluções, foi empregue como branco o tampão utilizado na preparação das respetivas soluções. Para as dispersões foi utilizado como branco água Millipore e antes de cada medição, as amostras foram diluídas (1:20) e dispersas no ultrassom.

## Capítulo 3:

Modificação de elétrodos de ouro com  
nanopartículas de óxido de ferro  
funcionalizadas

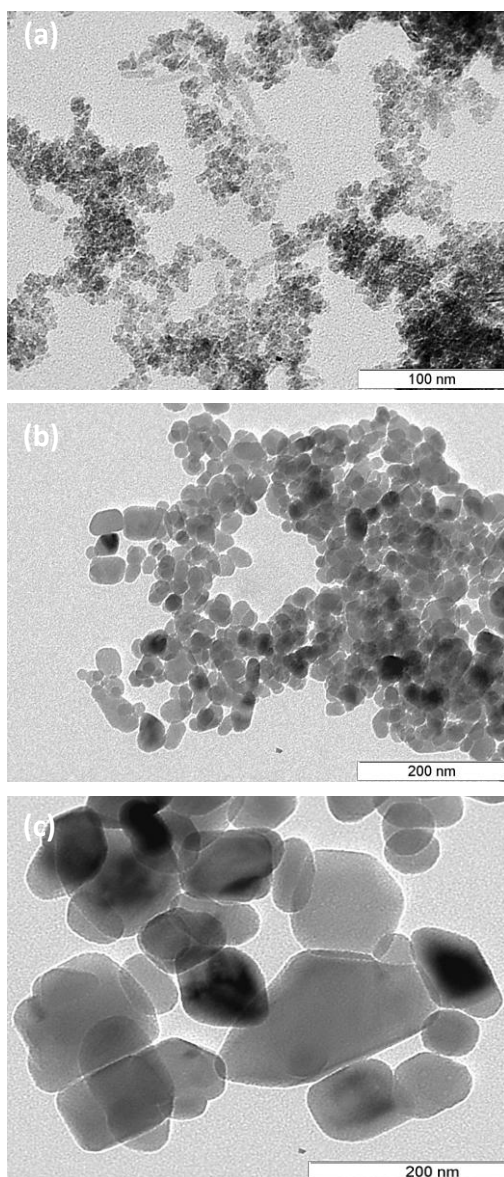




A caracterização morfológica das nanopartículas de óxido de ferro foi efetuada por TEM e AFM. De forma a verificar a modificação das NPs, foram realizados estudos por voltametria cíclica das NPs funcionalizadas em elétrodos de ouro (Au 111). Para verificar o sucesso da funcionalização destas partículas, foram ainda efetuados estudos em solução por espectroscopia de UV-Vis.

### 3.1 Caracterização morfológica das nanopartículas de óxido de ferro

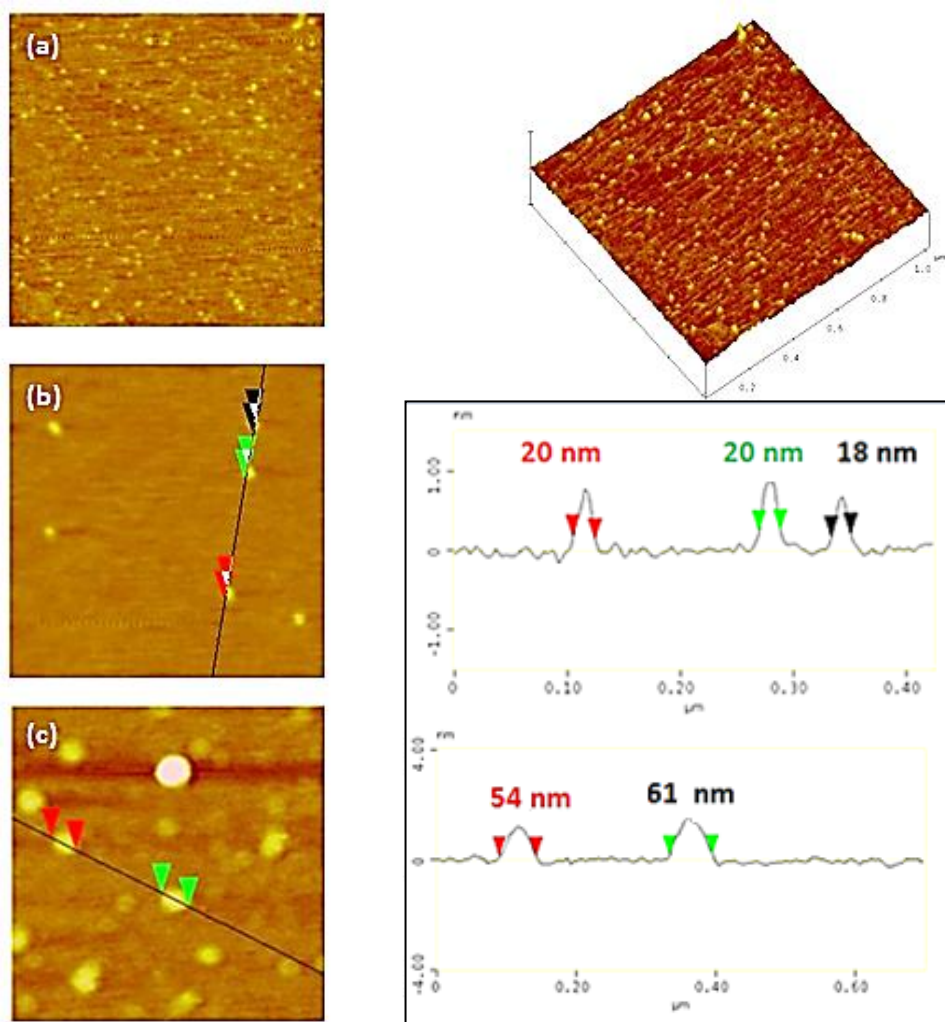
Executaram-se estudos por TEM e AFM de forma a observar a morfologia das NPs e medir o seu tamanho médio. Na figura 3.1 apresentam-se imagens TEM representativas das NPs utilizadas.



**Figura 3.1** - Imagens TEM dos 3 tipos de NPs utilizadas, com tamanho médio de (a) 7 nm, (b) 20 nm e (c) 60 nm.

Foi possível verificar que o tamanho médio das NPs é, em todos os casos, concordante com os valores obtidos por difração de raios-X <sup>[34]</sup> anteriormente referidos (7, 20 e 60 nm), observando-se, no entanto, alguma dispersão no tamanho e forma.

Para avaliar os tamanhos das NPs por AFM, estas foram depositadas sobre mica e na figura 3.2 apresentam-se as imagens obtidas e os respetivos perfis. Deste modo, confirmou-se por AFM que o tamanho médio correspondente às NP20 e NP60 são concordantes com os obtidos por TEM, observando igualmente alguma dispersão de tamanho. O diâmetro médio estimado por AFM para as NP7 (10 nm) é ligeiramente superior ao obtido por TEM, o que pode ser explicado pelo facto das partículas terem uma dimensão próxima ou inferior à da ponta de AFM.

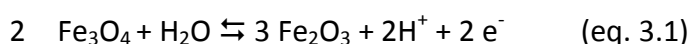


**Figura 3.2** - Imagens de AFM e respetiva análise de secção das NPs com tamanhos médios de (a) 7 nm (b) 20 nm (c) 60 nm sobre mica.

### 3.2 Caracterização eletroquímica das nanopartículas de óxido de ferro

As nanopartículas de óxido de ferro utilizadas neste trabalho foram sintetizadas através dos métodos redução-precipitação (NP7) e co-precipitação (NP20 e NP60). Independentemente do método utilizado na síntese, estas nanopartículas podem ser descritas como  $\text{Fe}_{3-x}\text{O}_4$ , tendo-se verificado que  $x$  aumenta quando o tamanho das partículas diminui<sup>[34]</sup>, aproximando-se mais duma composição próxima da maghemite ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) quando o tamanho é muito pequeno, como é o caso das nanopartículas com 7 nm. Deste modo, foi possível verificar que a composição das nanopartículas está diretamente relacionadas com o seu tamanho, e de uma forma geral, corresponde a magnetite oxidada<sup>[34]</sup>.

Existem vários estudos na literatura que descrevem o comportamento eletroquímico da magnetite, tendo sido reportadas várias reações, que dependem, por exemplo, da forma de magnetite usada (i.e, magnetite policristalina, forma coloidal), mas também dos valores de pH do meio<sup>[75-76]</sup>. De uma forma geral, pode-se concluir que uma das reações mais consensuais é aquela que leva à formação de  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  (maghemite)<sup>[77-79]</sup>, tal como descrito pela equação 3.1, embora produtos como  $\alpha\text{-FeOOH}$  e outras espécies como por exemplo hidróxidos e outros oxi-hidróxidos também sejam reportadas<sup>[80]</sup>.



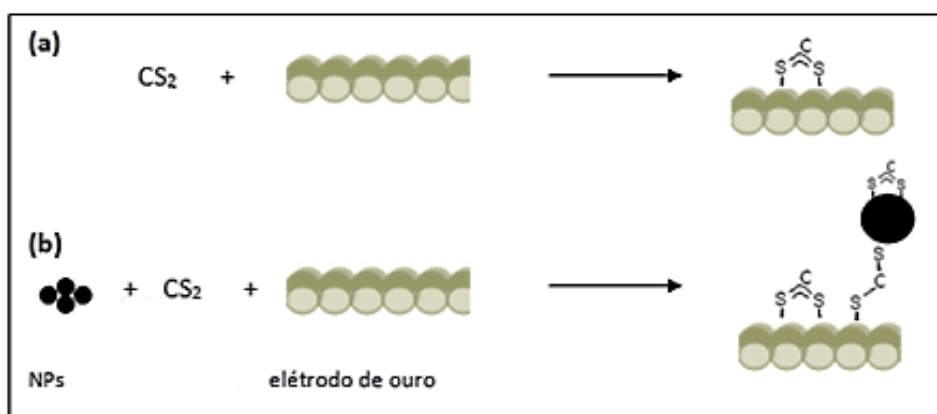
J. W. Halley *et al.*<sup>[79]</sup> observaram por voltametria cíclica em meio básico, que a reação redox da magnetite ocorre a ca. 0.3 V vs. SCE, um valor consistente com o obtido para o potencial de equilíbrio de suspensões coloidais<sup>[76]</sup>. Como referido no capítulo 1.2, a magnetite apresenta uma estrutura espinela inversa, e pode ser genericamente descrita como  $(\text{Fe}^{2+})_{\text{tet}}(\text{Fe}^{3+})_{\text{oct}}(\text{Fe}^{3+})_{\text{tet}}(\text{O}^{2-})_4$ . Esta estequiometria tem sido usada para explicar os resultados eletroquímicos, que mostram ser mais difícil de detetar a resposta dos iões  $\text{Fe}^{2+}$  do que dos iões  $\text{Fe}^{3+}$ , principalmente no primeiro varrimento de potencial<sup>[81]</sup>. No entanto, a composição das nanopartículas, e portanto, o seu tamanho médio, deverá também ter um papel importante nos resultados de voltametria cíclica, sendo que para o

caso das partículas mais pequenas, terá de se ter em consideração que deverão conter muito pouco  $\text{Fe}^{2+}$ , sendo a sua composição próxima da maghemite,  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ .

Com o objetivo de estudar o comportamento eletroquímico das nanopartículas de óxido de ferro utilizadas neste trabalho, estas foram imobilizadas em elétrodos por duas metodologias distintas: adsorção covalente recorrendo ao dissulfureto de carbono e a uma SAM de ditiol e adsorção física por *drop casting*.

### 3.2.1 Imobilização de nanopartículas de óxido de ferro via reação com $\text{CS}_2$

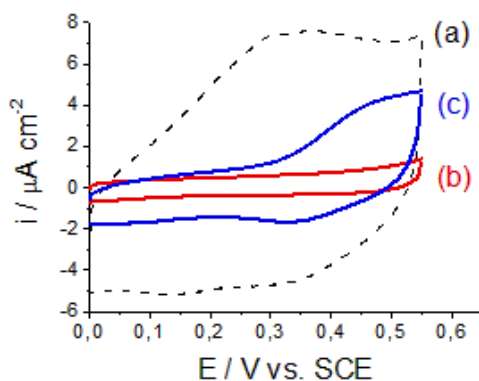
As nanopartículas de óxido de ferro foram imobilizadas de acordo com a metodologia esquematicamente representada na figura 3.3. A caracterização eletroquímica destes elétrodos modificados foi comparada com superfícies de ouro funcionalizadas com apenas  $\text{CS}_2$ .



**Figura 3.3** - Metodologias utilizadas para a modificação da superfície do Au(111): (a)  $\text{Au}(111)/\text{CS}_2$ ; (b)  $\text{Au}(111)/\text{CS}_2/\text{NPs}$ .

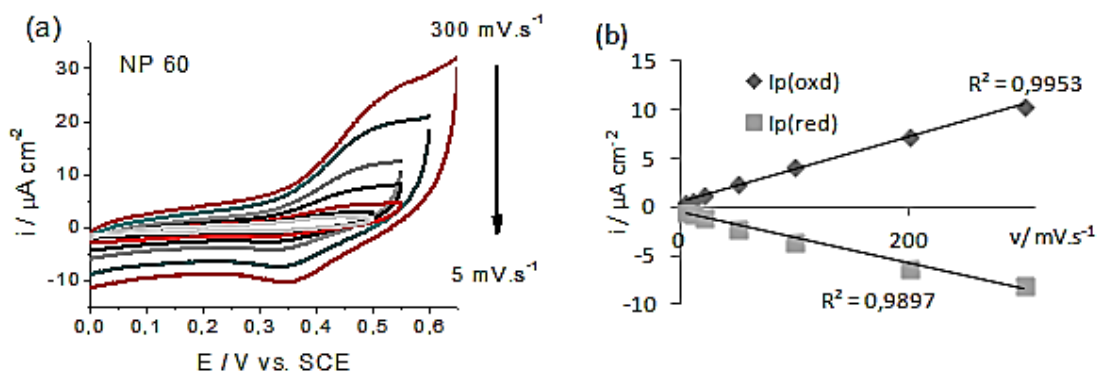
Na figura 3.4 apresentam-se os voltamogramas cíclicos de um elétrodo de ouro limpo (a) e após modificação com  $\text{CS}_2$  (b) em tampão fosfato (pH 7). Devido à forte interação dos átomos de enxofre com o ouro, forma-se uma monocamada de moléculas de  $\text{CS}_2$  que reduz drasticamente a capacidade da dupla camada detetada no ouro limpo, apesar de  $\text{CS}_2$  ser uma molécula muito pequena. Este comportamento é o esperado para elétrodos modificados com monocamadas auto-montadas de alcanotióis <sup>[69]</sup>, que normalmente reduzem ainda mais a capacidade da dupla-camada por conterem cadeias alquila que

estabelecem ligações intermoleculares fortes que promovem um maior bloqueio da superfície de ouro aos iões da solução. Quando se modifica o ouro na presença de CS<sub>2</sub> e NPs (figura 3.4 c), observa-se um processo redox,  $E_{1/2} = 0.4$  V vs. SCE, que poderá ser atribuído à conversão eletroquímica da magnetite de acordo com a eq. 3.1, anteriormente descrita.



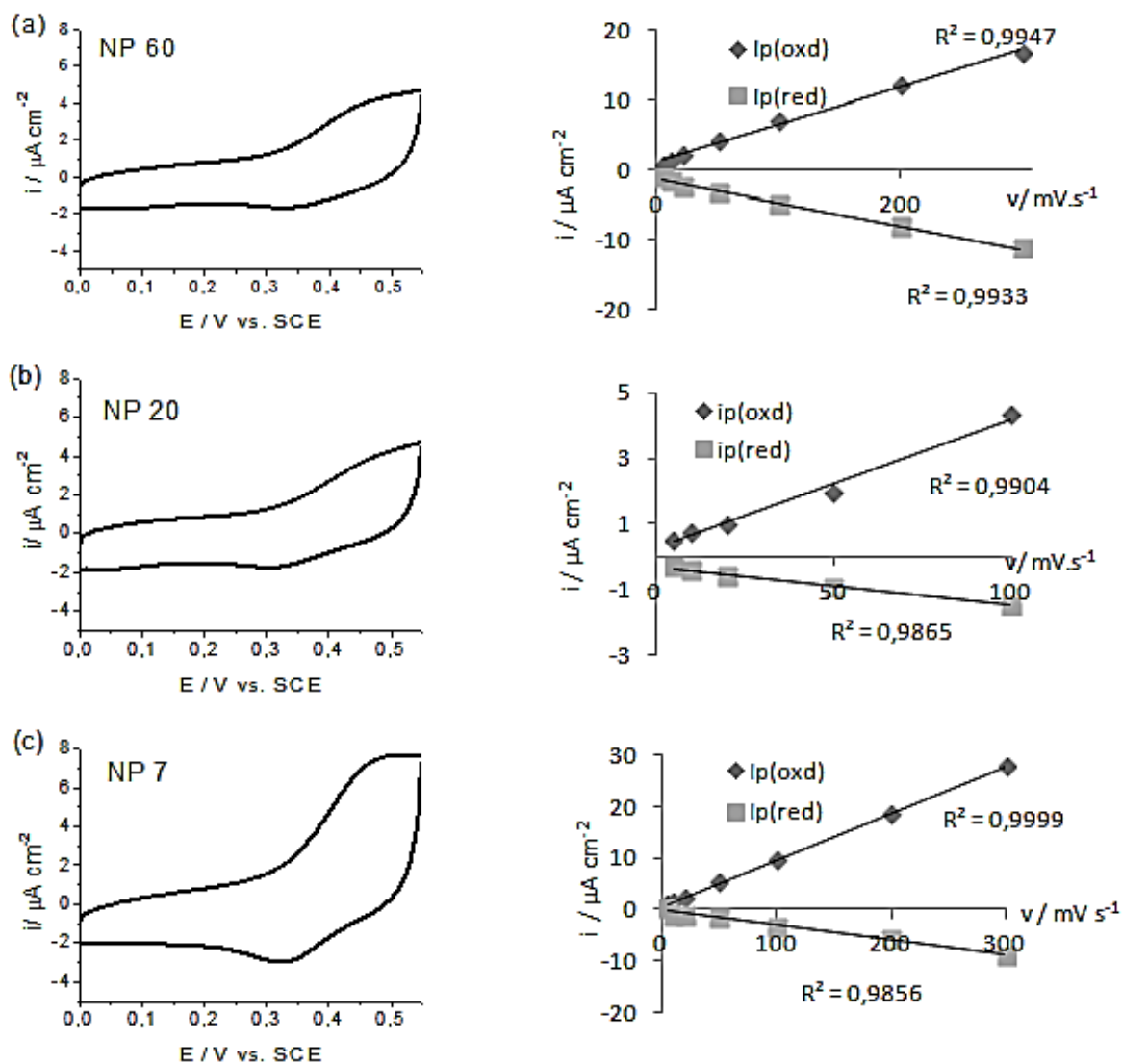
**Figura 3.4** - Voltamogramas cíclicos obtidos em 0.1 mol L<sup>-1</sup> PBS (pH 7) de: (a) Au(111), (b) Au(111)/CS<sub>2</sub>, (c) Au(111)/CS<sub>2</sub>/NP20 ( $v = 50$  mV s<sup>-1</sup>).

Foram também realizados estudos a diferentes velocidades de varrimento em meio ácido (pH 4.6) e em meio neutro (pH 7), cujos resultados para elétrodos modificados com NPs de 60, 20 e 7 nm foram resumidos nas figuras 3.5 e 3.6. Através da representação gráfica da corrente de pico (oxidação e redução) *versus* velocidade de varrimento de potencial, verifica-se a dependência linear entre estes parâmetros, principalmente para os processos de oxidação. Este comportamento indica que o processo redox em estudo não é controlado por difusão e sugere que as espécies eletroativas estejam adsorvidas de um modo estável na superfície do ouro, em ambos os valores de pH estudados.



**Figura 3.5** - (a) Voltamogramas cíclicos de Au (111) modificado com CS<sub>2</sub> e NP60 em PB-Cit 0.1 mol L<sup>-1</sup> (pH 4.6) e a diferentes velocidades de varrimento [300 – 5] mV s<sup>-1</sup>, (b) Representação gráfica de  $i_p$  vs  $v$ .

Muito embora os potenciais obtidos para os processos redox das nanopartículas estejam muito próximo dos esperados para a conversão de  $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$  em solução [56], o processo identificado não poderá corresponder a uma dissolução das nanopartículas imobilizadas, uma vez que em ambos os pH estudados a resposta eletroquímica é estável às várias velocidades de varrimento e ao longo do tempo, como referido anteriormente.



**Figura 3.6** - Voltamogramas cíclicos de Au (111) modificado com CS<sub>2</sub> e diferentes NPs, (a) NP60, (b) NP20, (c) NP7, em PBS 0.1 mol L<sup>-1</sup> (pH 7),  $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$  e respectivas representações gráficas de  $i_p$  vs  $v$ .

Na tabela 3.1 encontram-se os potenciais redox e as densidades de corrente dos picos, relativos a estes estudos (Figuras 3.5 e 3.6). A partir da integração da área dos picos redox obteve-se a carga elétrica envolvida no processo de transferência eletrônica, e

estimaram-se os valores de recobrimentos superficiais das diferentes NPs, recorrendo à eq. 2.3, e assumindo a transferência de 1 eletrão (eq. 3.1).

**Tabela 3.1** - Valores de potenciais ( $E_p$ ), recobrimento superficial ( $\Gamma$ ) e densidades de corrente dos picos ( $i_p$ ) das diferentes NPs quimicamente adsorvidas no Au(111) com  $CS_2$ , obtidos a partir dos voltamograma cíclicos registados a  $50 \text{ mV s}^{-1}$ .

pH	NPs nm	$E_p^a$	$E_p^c$	$\Delta E_p$	$i_p^a$	$i_p^c$	$\Gamma^a/10^{-10}$	$\Gamma^c/10^{-10}$
			V		$\mu\text{A cm}^{-2}$		$\text{mol cm}^{-2}$	
4.6 (PB/Cit)	60	0.45	0.34	0.16	7.22	-2.84	0.18	0.56
7 (PBS)	60	0.44	0.36	0.15	4.00	-1.68	0.09	0.18
	20	0.45	0.33	0.16	4.03	-1.78	0.04	0.30
	7	0.45	0.33	0.15	7.56	-3.02	0.23	0.80

Da análise destes resultados, verifica-se que os picos anódicos e catódicos se encontram todos centrados nos potenciais  $E_p^a = 0.45 \text{ V}$  e  $E_p^c = 0.33 \text{ V}$  vs. SCE, embora os valores de recobrimento superficial e de densidade de corrente apresentem valores dispersos, o que pode ser justificado pelo facto destes parâmetros estarem relacionados com a quantidade de NPs que se encontram na superfície do eléctrodo e/ou com a diferente eletroatividade das nanopartículas. Não se verificando uma relação direta entre os valores de recobrimento superficial e o tamanho das NPs, pode-se deduzir que os valores mais elevados, estimados para as NP7, refletem uma maior quantidade de nanopartículas no eléctrodo.

Embora estudos semelhantes não tenham ainda sido reportados, o trabalho realizado por Ajeet Kaushik *et al.* <sup>[27]</sup> evidenciam um aumento de eletroatividade de eléctrodos modificados com NPs de natureza semelhante. Estes autores estudaram um eléctrodo de ITO com nanopartículas de óxido de ferro modificadas com quitosano (CH),  $\text{CH-Fe}_3\text{O}_4$ . Realizaram medidas eletroquímicas utilizando as técnicas de espectroscopia eletroquímica de impedância e voltametria cíclica, e usando como eletrólito o tampão fosfato, pH 7. Comparando os resultados entre o CH/ITO e  $\text{CH-Fe}_3\text{O}_4$ /ITO verificaram que a resistência à transferência electrónica era menor para o filme contendo as

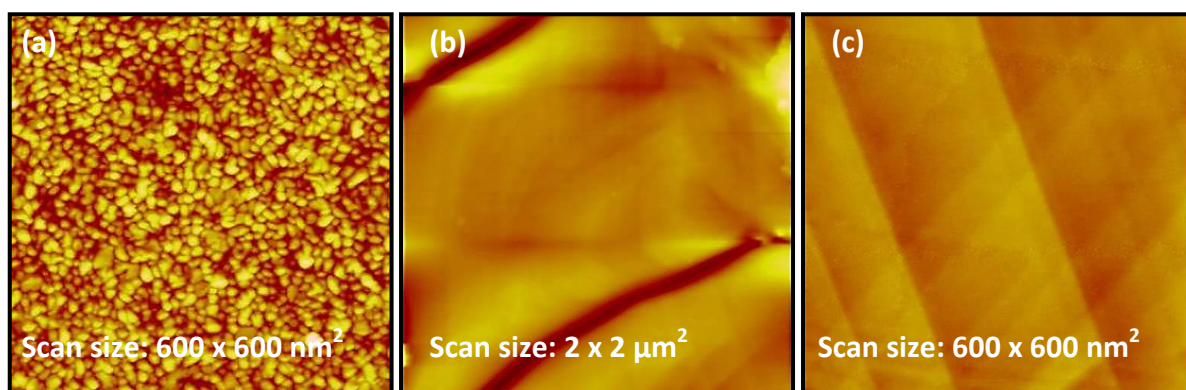
nanopartículas, deduzindo que atuam também como elétrodos em nano escala, promovendo a mobilidade dos elétrons na superfície do eletrodo e facilitando a transferência eletrônica.

Por comparação com os resultados obtidos neste trabalho, na presença de NPs e CS<sub>2</sub> (reação num só passo) observa-se uma reação faradaica devido ao processo eletroquímico da magnetite. Em contrapartida, um eletrodo apenas modificado com uma monocamada de CS<sub>2</sub> não exibe qualquer sinal redox, diminuindo bastante a capacidade da dupla-camada do eletrodo de ouro.

### **3.2.2 Caracterização morfológica dos elétrodos de ouro modificados com CS<sub>2</sub> e nanopartículas de óxido de ferro**

Os elétrodos de ouro foram caracterizados morfológicamente por AFM, de modo a confirmar a presença de nanopartículas na sua superfície.

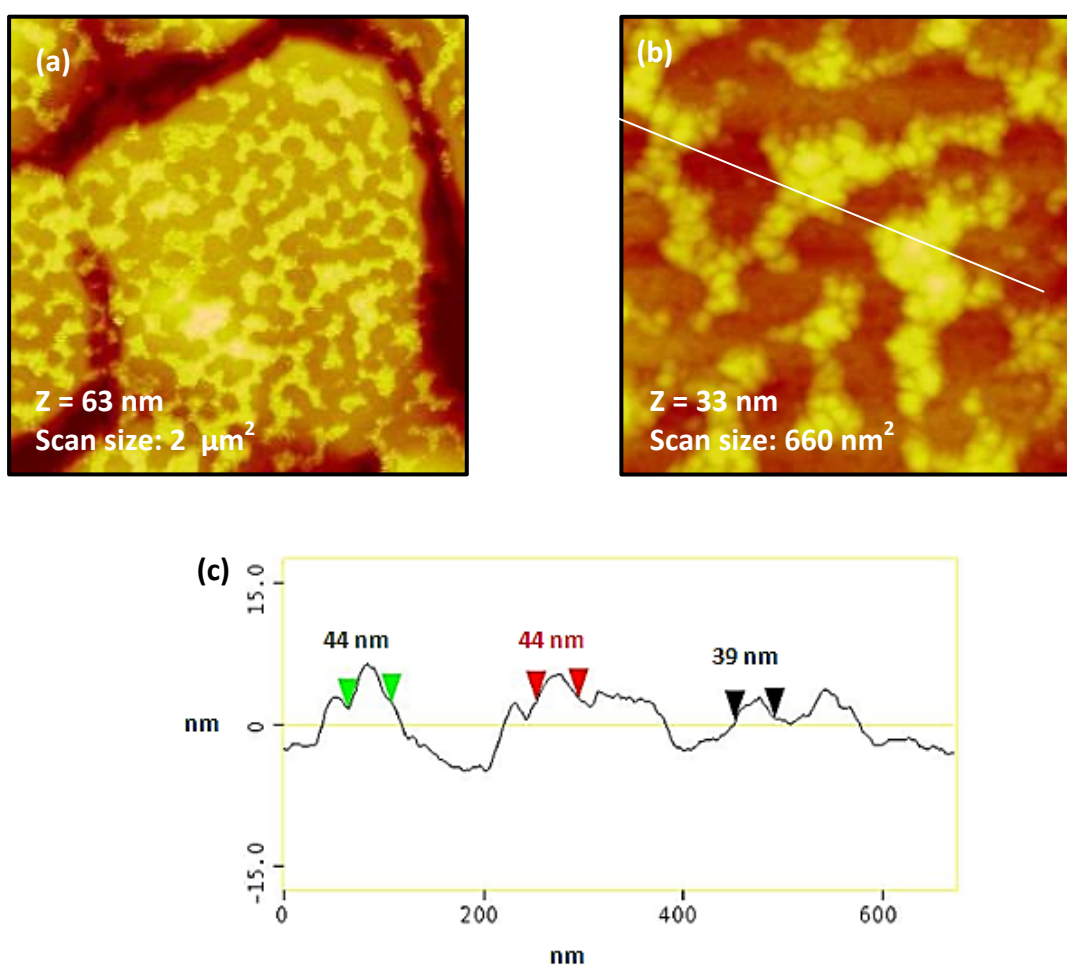
Na figura 3.7, apresentam-se imagens de AFM do eletrodo de ouro limpo. Verifica-se que a placa de ouro (figura 3.7 a) tem uma morfologia granular, e que após o passo de aquecimento à chama (figura 3.7 b) se apresenta localmente muito plano com os sulcos típicos <sup>[82-83]</sup> resultantes deste tratamento. Numa imagem mais detalhada da superfície (figura 3.7 c) observam-se os terraços monoatômicos característicos do ouro (111), separados por 0.24 nm <sup>[82]</sup>. É muito importante que o ouro seja atômica e lisa para se poderem verificar as alterações morfológicas que ocorrerão após a sua modificação, nomeadamente adsorção de nanopartículas ou biomoléculas, cujas dimensões não diferem muito das dos grãos do ouro antes do aquecimento.



**Figura 3.7** - Imagens de AFM do eletrodo de ouro limpo (a) sem tratamento térmico (b) e (c) com tratamento térmico (*flaming annealing*).



Preparou-se um elétrodo de ouro contendo CS<sub>2</sub> e nanopartículas de 60 nm em tampão fosfato salino, pH 7. Nas imagens de AFM apresentadas na figura 3.8, observam-se aglomerados de nanopartículas adsorvidos de um modo estável nas placas de ouro. Muito possivelmente, dada a espontaneidade do processo de adsorção e a grande afinidade entre o enxofre e o ouro, existem moléculas de CS<sub>2</sub> que não reagiram com as nanopartículas e deste modo ambos os enxofres se adsorvem ao elétrodo de ouro. Dada a sua pequena dimensão, estas moléculas, CS<sub>2</sub>, não são visíveis nestas condições experimentais. As imagens apontam ainda para a possibilidade do CS<sub>2</sub> ligar nanopartículas entre si.



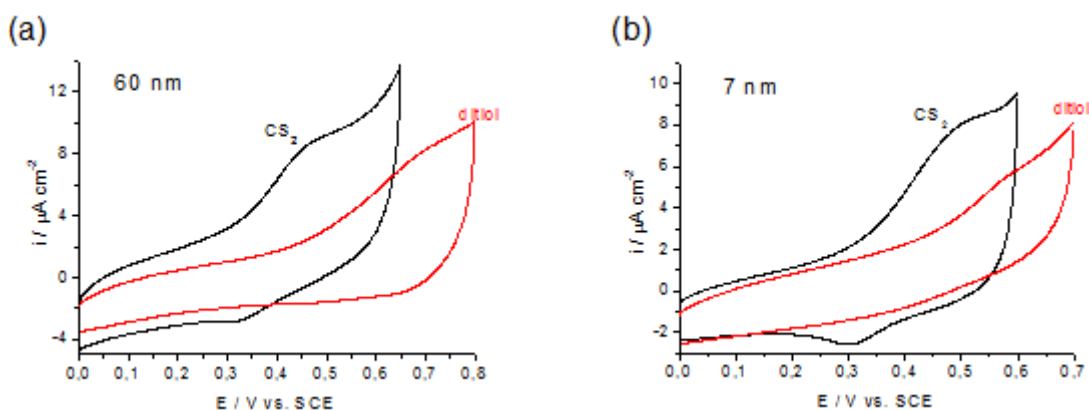
**Figura 3.8** - Imagens de AFM da superfície do elétrodo de ouro modificado com CS<sub>2</sub> e NP60. Análise de secção da figura (c).

As imagens das figuras 3.7 e 3.8, permitem confirmar que as nanopartículas, com um diâmetro de cerca de 40 nm, se encontram adsorvidas no elétrodo de ouro, corroborando os resultados de voltametria cíclica.

### 3.2.3 Imobilização covalente de nanopartículas em SAMs de ditiol

Em trabalhos anteriormente publicados <sup>[43]</sup> foi utilizado um ditiol para adsorver nanopartículas de ouro. Verificou-se que um dos grupos tióis permite a modificação da superfície do ouro, devido à forte afinidade entre ambos. O segundo grupo -SH encontra-se livre na interface SAM/solução, permitindo uma ligação a nanopartículas metálicas. Neste processo de auto-montagem, podem surgir algumas dificuldades quando se utilizam ditióis de cadeia alquila igual ou superior a 10 átomos de carbono, devido à eventualidade de ambos os grupos se ligarem ao ouro, levando à perda da organização e compactação das SAMs <sup>[43]</sup>. De forma a verificar se o dissulfureto de carbono seria o melhor grupo para imobilizar as nanopartículas de óxido de ferro, foram efetuados estudos utilizando um ditiol (hexanoditiol) para comparação.

Na figura 3.9 encontram-se representados os comportamentos eletroquímicos dos elétrodos modificados com CS<sub>2</sub> e hexanoditiol, usando nanopartículas de 60 e 7 nm. Verifica-se que a utilização de CS<sub>2</sub> para a imobilização destas nanopartículas providencia melhores resultados do que o ditiol, apresentando picos redox mais definidos, para os dois tipos de NPs utilizados (NP60 e NP7). Este resultado poder-se-á dever ao facto do ditiol conter uma cadeia de alcanotiol com seis átomos de carbono, que pode oferecer alguma resistência à transferência eletrónica entre o elétrodo e as nanopartículas imobilizadas <sup>[43]</sup>, enquanto que o CS<sub>2</sub>, por ser uma molécula muito pequena, permite uma troca rápida de eletrões entre as NPs que se encontram mais próximas da superfície do elétrodo.



**Figura 3.9** - Voltamogramas cíclicos do estudo redox dos elétrodos modificados com NPs e CS<sub>2</sub> ou NPs e ditiol em PBS 0.1 mol L<sup>-1</sup> (pH 7) e v = 50 mV s<sup>-1</sup>: (a) NP60, (b) NP7.

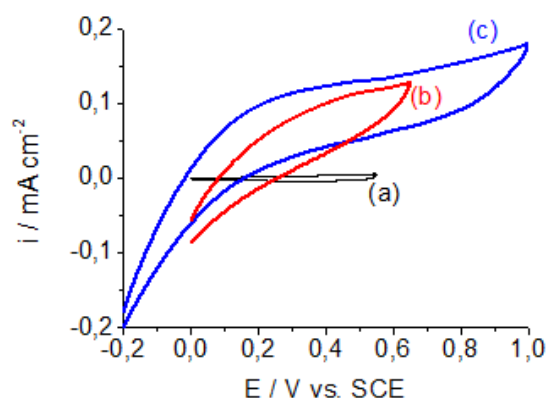
### 3.2.4 Adsorção física de nanopartículas na superfície do eletrodo de ouro

Depositaram-se nanopartículas de óxido de ferro (NP20) num eletrodo de ouro recorrendo a adsorção física por *drop casting*, como exemplifica a figura 3.10. As preparações dos eletrodos encontram-se descritas nos detalhes experimentais (capítulo 2.1.4).



**Figura 3.10** - Metodologia utilizada para a modificação da superfície do Au(111) com as NPs fisicamente adsorvidas à sua superfície.

A figura 3.11 ilustra as respostas eletroquímicas do eletrodo limpo e após modificação com NP20. Verifica-se que na presença de nanopartículas, existe um aumento significativo das correntes capacitivas e também da corrente faradaica a potenciais mais negativos, aos dois pH testados (7 e 4.6), que poderá estar associada com a redução de oxigénio e/ou evolução do hidrogénio.



**Figura 3.11** - Voltamogramas cíclicos do eletrodo de Au(111) e das NPs adsorvidas fisicamente à sua superfície e  $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ : (a) Eletrodo limpo, (b) NP20 em PB  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 7), (c) NP20 em PB-Cit  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 4.6).

Este resultado demonstra a presença de nanopartículas no eletrodo, uma vez que é comum os óxidos metálicos nanos-estruturados e semi-condutores apresentarem uma corrente capacitiva considerável <sup>[84]</sup>. Esta corrente não está associada às reações

eletroquímicas, como o caso das correntes faradaicas, mas sim a uma acumulação ou remoção das cargas elétricas da dupla camada <sup>[84]</sup>.

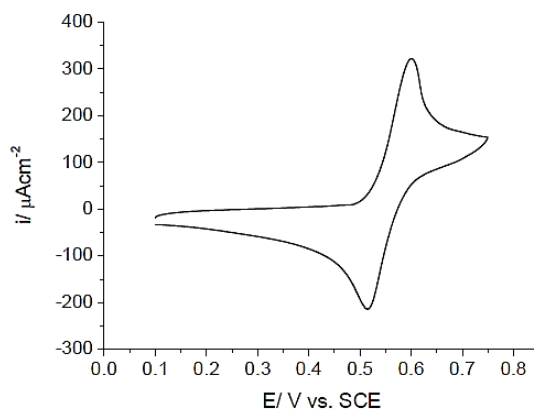
Devido à falta de estabilidade observada entre a ligação física das nanopartículas de óxido de ferro e o eletrodo de ouro, não foram prolongados os estudos referentes ao *Drop Casting*. Deste modo, apenas se quis demonstrar que as NPs fisicamente adsorvidas apresentam um comportamento eletroquímico diferente dos eletrodos modificados com CS<sub>2</sub> e nanopartículas adsorvidas no eletrodo de ouro. Verificou-se que quando as NPs se encontram quimicamente ligadas ao eletrodo, e distribuídas na sua superfície, obtém-se uma corrente faradaica, atribuída à oxidação da magnetite. Caso se encontrem fisicamente adsorvidas pelo método de preparação utilizado, verifica-se apenas uma corrente capacitiva protuberante.

### 3.2 Imobilização de nanopartículas de óxido de ferro funcionalizadas com epinefrina por reação com CS<sub>2</sub>

O comportamento eletroquímico de diversos compostos com ação biológica contendo grupos amina, como a epinefrina e a dopamina, têm sido exaustivamente estudados <sup>[47]</sup>. A possibilidade de imobilizar num só passo compostos contendo aminas, principalmente secundárias, por reação com o CS<sub>2</sub>, através da formação de ditiocarbamatos que se adsorvem espontaneamente na superfície do ouro, tem sido reportado como alternativa às SAMs <sup>[46,85]</sup>. A epinefrina, que é eletroquimicamente ativa, tem a capacidade de estabelecer uma ligação forte e eficaz com o carbono do CS<sub>2</sub> que possui um dipolo positivo. Apresenta um comportamento redox, sensível ao pH da solução, correspondente ao processo de oxidação da hidroquinona em quinona e do processo de redução inverso, envolvendo a transferência de dois elétrons e dois prótons <sup>[47]</sup>, tal como apresentado na figura 3.12.



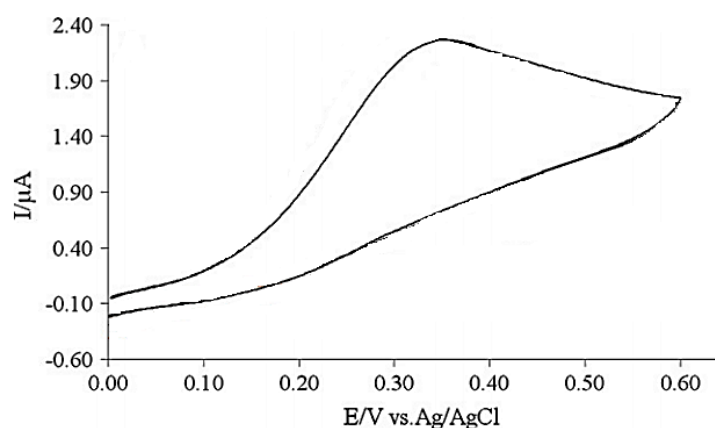
**Figura 3.12** - Representação do processo redox reversível das formas hidroquinona /quinona, da epinefrina.



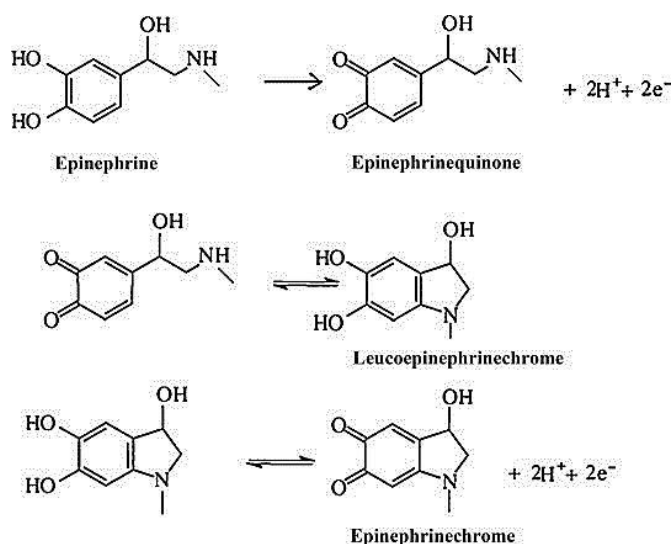
**Figura 3.13** - Voltamograma cíclico de 1 mmol L<sup>-1</sup> de epinefrina em solução, em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.1 mol L<sup>-1</sup> e  $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$  [47].

Na figura 3.13 é possível observar o voltamograma cíclico da epinefrina em solução (pH 1) [47], correspondente à conversão redox exemplificada na figura 3.12, centrado a  $E_{1/2} = 0.56 \text{ V}$ ,  $\Delta E_p = 0.09 \text{ V}$ .

Motaghedifarda *et al.* [86] estudaram o comportamento eletroquímico da epinefrina em solução de PBS (pH 6), observando um processo de oxidação irreversível a 0.29 V (vs. SCE) (Figura 3.14). A irreversibilidade do processo pode ser explicada pela elevada estabilidade da forma oxidada da epinefrina em meios não ácidos, sendo neste caso favorecida a ciclização intramolecular obtendo *leucoepinephrinechrome* (figura 3.15). A eletro-oxidação de *leucoepinephrinechrome* a *epinephricrome* manifesta-se através da presença de um processo redox com  $E_{1/2} = -0.10 \text{ V vs SCE}$  [87].

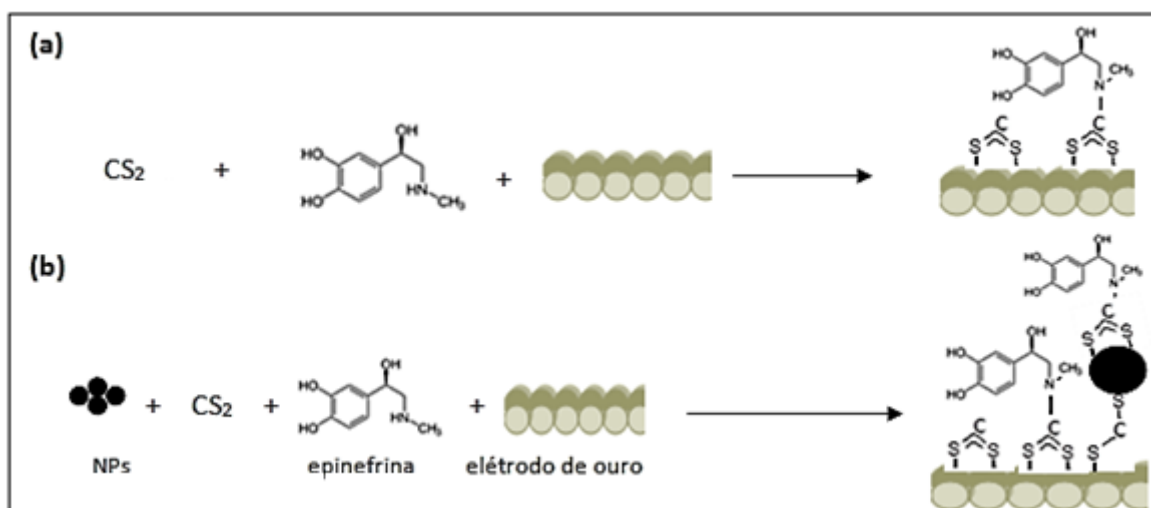


**Figura 3.14** – Voltamograma cíclico de  $2.0 \times 10^{-2} \text{ mmol L}^{-1}$  de epinefrina em solução, em 0.1 mol L<sup>-1</sup> PBS (pH 6) e  $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$  [86].



**Figura 3.15** - Oxidação eletroquímica da epinefrina <sup>[88]</sup>.

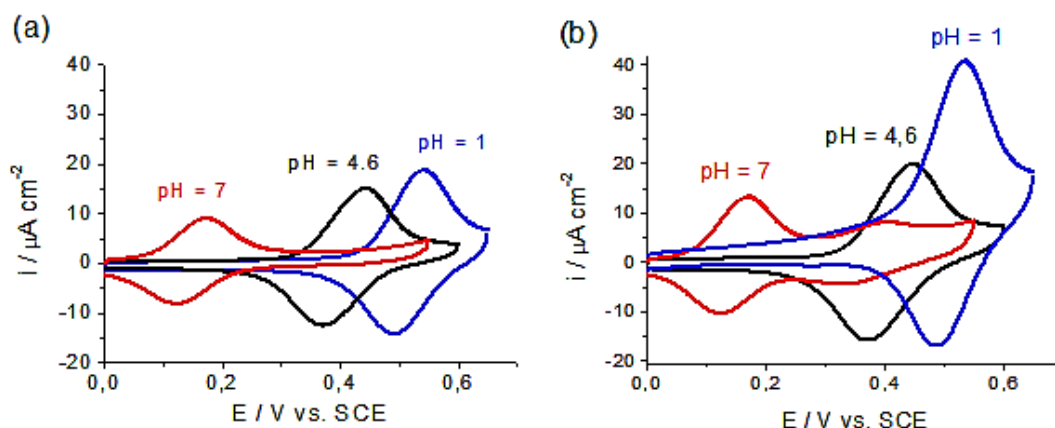
Neste trabalho prepararam-se os elétrodos modificados **Au(111)/CS<sub>2</sub>/Epinefrina** (figura 3.16 a) e **Au(111)/CS<sub>2</sub>/NPs/Epinefrina** (figura 3.16 b), variando-se neste último caso o tamanho das nanopartículas (7, 20 e 60 nm). As preparações destes elétrodos encontram-se descritas no capítulo 2.1.4.



**Figura 3.16** - Metodologia utilizada para a modificação da superfície do elétrodo: (a) **Au(111)/CS<sub>2</sub>/Epinefrina** ; (b) **Au(111)/CS<sub>2</sub>/NPs/Epinefrina**.

Inicialmente, efetuou-se o estudo eletroquímico de **Au(111)/CS<sub>2</sub>/Epinefrina** utilizando três eletrólitos com pH diferentes: 0.05 mol L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (pH 1), 0.1 mol L<sup>-1</sup> PB-CIT (pH 4.6) e 0.1 mol L<sup>-1</sup> PBS (pH 7), de modo a compreender a estabilidade da epinefrina imobilizada. Na figura 3.17 (a) observa-se que em todos os voltamogramas cíclicos, os sinais da

epinefrina apresentam picos redox reversíveis quase simétricos, e que os potenciais, como esperado, variam consoante o pH.



**Figura 3.17** - Voltamogramas cíclicos do estudo redox a  $50 \text{ mV s}^{-1}$  em diferentes eletrólitos. (a) **Au(111)/CS<sub>2</sub>/Epinefrina** e (b) **Au(111)/CS<sub>2</sub>/NP20/Epinefrina**.

A pH 1, o pico ocorre a potenciais mais elevados ( $E_{1/2} = 0.515 \text{ V}$ ) do que a pH 7 ( $E_{1/2} = 0.145 \text{ V}$ ). Verifica-se que a pH 1, o processo tem intensidade de corrente mais elevada,  $i_p^a = 18.6 \mu\text{A cm}^{-2}$ , pois é a pH baixos que a conversão hidroquinona/quinona (figura 3.12 e 3.13) deverá ser facilitada.

O fato de o eletrodo modificado com epinefrina e CS<sub>2</sub> apresentar processos redox reversíveis, indica que a epinefrina deverá estar ligada à superfície de ouro por uma ligação ditiocarbamato (N-C-S<sub>2</sub>) impedindo deste modo que a ciclização pelo grupo amina ocorra ( $E_{1/2} = 0.15 \text{ V}$  (pH 7)) [86]. Quando a epinefrina se encontra imobilizada é possível verificar que o potencial é menos positivo do que em solução, detetando-se os seus processos redox a  $E_{1/2} = 0.52 \text{ V}$  (pH 1), sendo que em solução obtém-se  $E_{1/2} = 0.56 \text{ V}$  (pH 1). Assim, pode-se concluir que a transferência eletrónica é facilitada quando a epinefrina se encontra imobilizada.

Realizaram-se também estudos a pH 4.6 de forma a encontrar um compromisso entre a estabilidade da epinefrina e das nanopartículas de óxido de ferro que se pretendiam incluir na superfície. A pH 4.6 o processo redox da epinefrina ocorre a potenciais intermédios com valores de corrente ( $i_p^a = 14.9 \mu\text{A cm}^{-2}$ ) mais próximos dos obtidos em meio ácido.

O comportamento dos eletrodos preparados na presença de NP20, **Au(111)/CS<sub>2</sub>/NP20/Epinefrina**, é ilustrado na figura 3.17 (b). Embora se observem os picos da epinefrina ao mesmo valor de potencial do que na Fig. 3.17 (a), sem NPs,

verifica-se, de um modo geral, um aumento das densidades de corrente de oxidação e de redução.

Os parâmetros eletroquímicos mais importantes, obtidos das figuras 3.17 (a) e (b), a diferentes pH, encontram-se resumidos na tabela 3.2.

**Tabela 3.2** - Valores de potenciais de pico ( $E_p$ ), da densidade de corrente de oxidação ( $i_p$ ) e das quantidades adsorvidas ( $\Gamma$ ), obtidos a partir das figuras 3.17 (a) e (b), para um eletrodo de Au (111) modificado com epinefrina na presença e ausência de NP20.

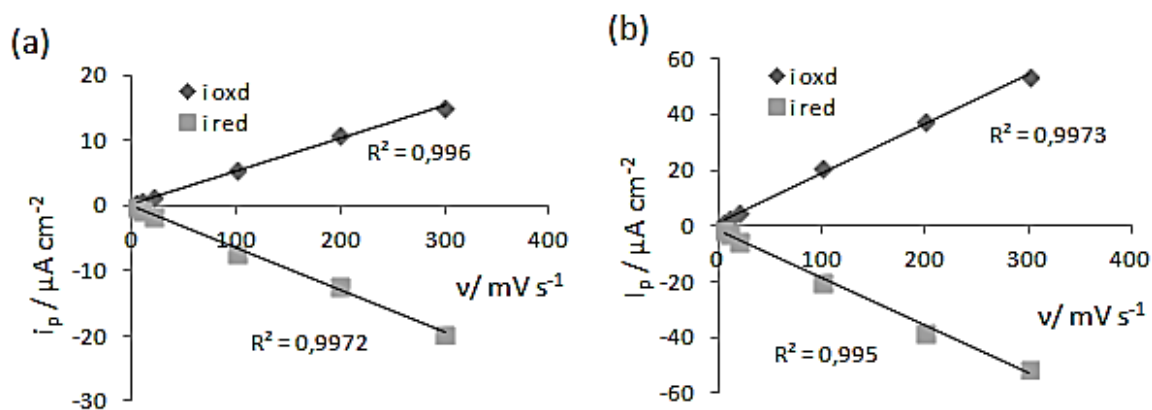
pH	$E_p^a$	$E_p^c$	$\Delta E_p$	$i_p^a$	$i_p^c$	$\Gamma^a/10^{-10}$	$\Gamma^c/10^{-10}$
	V			$\mu A\ cm^{-2}$		$mol\ cm^{-2}$	
Au(111)/CS <sub>2</sub> /Epinefrina							
≈ 1	0.54	0.49	0.05	18.6	-13.2	1.56	1.37
4,6	0.44	0,37	0.07	14.9	-11.5	1.53	1.43
7,0	0.17	0,12	0.05	8.5	-7.3	0.82	0.75
Au(111)/CS <sub>2</sub> / <b>NP20</b> /Epinefrina							
≈ 1	0.53	0.49	0.06	25.5	-19.9	2.80	2.15
4,6	0.44	0.37	0.07	19.4	-14.8	1.88	1.75
7,0	0.16	0.12	0.04	12.6	-8.7	1.05	0.77

Neste trabalho experimental, observa-se que com e sem NPs a um dado valor de pH, o potencial redox da epinefrina não varia, e os picos mantêm-se simétricos com valores de  $\Delta E_p$  inferiores aos obtidos para a epinefrina em solução ( $\Delta E_p = 0.09\ V$ )<sup>[47]</sup>. Também é possível verificar que, na presença das NPs, tanto a densidade de corrente como a quantidade adsorvida aumentam consideravelmente, sendo o sinal mais proeminente a pH 1,  $\Gamma^a = 2.8 \times 10^{-10}\ mol\ cm^{-2}$  *versus*  $\Gamma^a = 1.6 \times 10^{-10}\ mol\ cm^{-2}$  (sem NPs). É de realçar que a imobilização de epinefrina recorrendo ao CS<sub>2</sub> e na ausência de NPs, quando realizada em tampão PBS (pH 7), conduz a valores mais elevados de concentração superficial de epinefrina quando comparados aos valores obtidos quando a mesma reação foi realizada apenas em água ( $\Gamma^a = 0.7 \times 10^{-10}\ mol\ cm^{-2}$ )<sup>[47]</sup>. Ainda relevante é o fato de esta reação de um só passo se traduzir em maior quantidade de composto adsorvido do que por exemplo uma ligação covalente entre a dopamina e uma SAM de



DSP, onde apenas se obteve um recobrimento de  $\Gamma = 1 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$  [44]. Na presença de nanopartículas de óxido de ferro (NP20), a cobertura superficial de epinefrina obtida em meio aquoso tamponado é ligeiramente superior ao verificado num trabalho anterior com nanopartículas de ouro de dimensão semelhante [22], onde se obteve um recobrimento de  $\Gamma^a = 2.0 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$ . Assim, pode confirmar-se a adequabilidade deste método que ocorre num só passo, para modificar nanopartículas de óxido de ferro.

Foram também realizados estudos a diferentes velocidades de varrimento em meio ácido PB-Cit (pH 4.6) e em meio neutro (pH 7), em elétrodos modificados **Au(111)/CS<sub>2</sub>/NP20/Epinefrina**. Através da representação gráfica da corrente de pico (oxidação e redução) em função da velocidade de varrimento de potencial, verifica-se a dependência linear entre estes parâmetros, figuras 3.18 (a) e (b). Tal como foi observado no estudo dos elétrodos de **Au(111)/CS<sub>2</sub>/NPs**, este comportamento indica que as espécies se encontram adsorvidas de um modo estável na superfície do ouro, em ambos os casos estudados (pH 4.6 e pH 7).



**Figura 3.18** – Representações gráficas de  $i_p$  vs.  $v$  do elétrodo **Au(111)/CS<sub>2</sub>/NP20/Epinefrina** em (a) PBS 0.1 mol L<sup>-1</sup> (pH 7), (b) PB-Cit 0.1 mol L<sup>-1</sup> (pH 4.6).

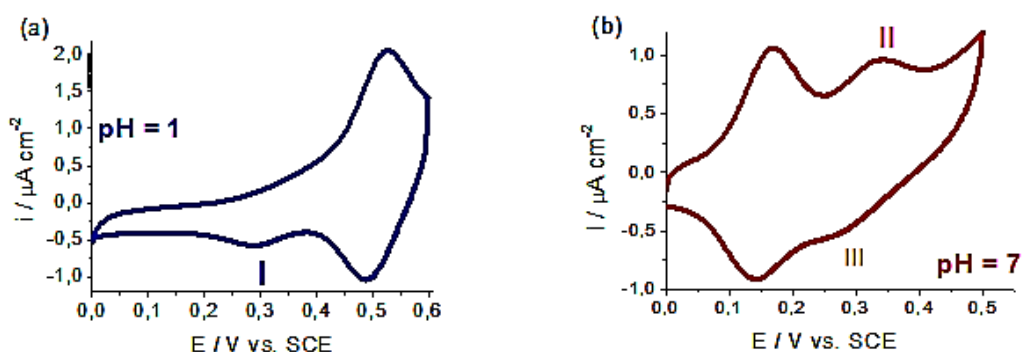
O voltamograma registado a pH 7, figura 3.17 (b), mostra dois processos redox, um já atribuído à epinefrina ( $E_{1/2} = 0.14 \text{ V}$ ), e o outro, com um valor de potencial mais positivo ( $E_{1/2} = 0.37 \text{ V}$ ), que poderá ser atribuído ao processo redox das NPs. Pode-se deduzir que, neste caso, foi possível observar o pico das NPs devido ao desvio do sinal da epinefrina. Na tabela 3.3 são comparados os valores de potencial e densidade de corrente

dos picos da epinefrina e das NPs a pH 7, obtidos a partir das figuras 3.4 (ausência de epinefrina) e 3.17 (b). Verifica-se que o sinal das NPs no eletrodo **Au(111)/CS<sub>2</sub>/NP20/Epinefrina**,  $E_p^a = 0.40$  V, se encontra apenas ligeiramente desviado do mesmo processo registrado para o eletrodo **Au(111)/CS<sub>2</sub>/NP20** ( $E_p^a = 0.45$  V). Deste modo, o eletrodo **Au(111)/CS<sub>2</sub>/NP20/Epinefrina** apresenta um processo redox cujo sinal das NPs evidencia uma maior reversibilidade (menor  $\Delta E_p$ ) do que nos eletrodos **Au(111)/CS<sub>2</sub>/NP20**, o que traduz uma transferência eletrônica facilitada quando as NPs são imobilizadas na presença de epinefrina.

**Tabela 3.3** - Valores de potenciais redox ( $E_p$ ) e da densidade de corrente dos picos ( $i_p$ ) atribuídos à epinefrina e às NP20 imobilizadas, obtidos a partir dos voltamogramas cíclicos (PBS 0.1 mol L<sup>-1</sup> (pH 7) e  $v = 50$  mV s<sup>-1</sup>) apresentados nas figuras 3.6 e 3.17 (b).

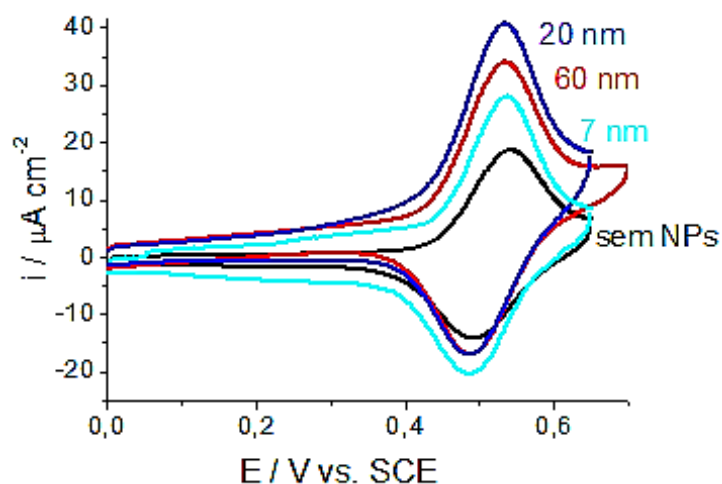
Au(111)/CS <sub>2</sub> / NP20 /Epinefrina						Au(111)/CS <sub>2</sub> / NP20				
	$E_p^a$	$E_p^c$	$\Delta E_p$	$i^a$	$i^c$	$E_p^a$	$E_p^c$	$\Delta E_p$	$i^a$	$i^c$
	V			$\mu A\ cm^{-2}$		V			$\mu A\ cm^{-2}$	
(Epinefrina)	0.16	0.12	0.04	12.6	-18.7	-	-	-	-	-
(NP20)	0.40	0.33	0.07	3.1	-3.3	0.45	0.33	0.14	4.15	-1.69

Com o eletrodo **Au/CS<sub>2</sub>/NP20/Epinefrina**, efetuaram-se ainda algumas experiências a velocidades de varrimento mais baixas, 5 mV s<sup>-1</sup>, a pH 1 e 7 para tentar observar o sinal das NPs melhor definido. Da análise da figura 3.19 verifica-se que utilizando como eletrólito 0.05 mol L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (pH 1) é possível observar o pico catódico I ( $E_p^c = 0.29$  V) das NPs, e com 0.1 mol L<sup>-1</sup> PBS (pH 7) o pico anódico II ( $E_p^a = 0.34$  V) e catódico III ( $E_p^c = 0.28$  V). O processo de oxidação a pH 1 deverá estar sobreposto com o início da oxidação da epinefrina. Estes resultados indicam que o eletrodo **Au(111)/CS<sub>2</sub>/NPs/Epinefrina** poderá ser potencialmente utilizado como sensor de pH, uma vez que o sinal da epinefrina muda drasticamente, enquanto que o potencial das NPs apenas se altera ligeiramente.



**Figura 3.19** – Voltamogramas cíclicos do eletrodo **Au(111)/CS<sub>2</sub>/NP20/Epinefrina**,  $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$  com: (a)  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0.05 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 1) e (b) PBS  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 7).

Na figura 3.20 encontram-se os resultados dos diversos ensaios realizados a pH 1 e onde se utilizaram NPs com diferentes tamanhos (7, 20 e 60 nm), **Au/CS<sub>2</sub>/NPs/Epinefrina**. Como já foi referido anteriormente, observa-se um aumento da intensidade de corrente da epinefrina devido à presença das NPs, que é dependente da quantidade destas últimas, ou seja de um efeito do aumento da área superficial do eletrodo (tabela 3.4). A superfície de Au(111) modificada com **CS<sub>2</sub>/Epinefrina** (na ausência de NPs) apresenta um processo de oxidação ao qual corresponde um recobrimento de aproximadamente de  $\Gamma^a = 1.6 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$ . Quando se adicionam diferentes nanopartículas de óxido de ferro, observa-se um aumento da intensidade de corrente do pico da epinefrina assim como das quantidades adsorvidas, sendo neste caso o valor máximo atingido para as NP20.



**Figura 3.20** - Voltamogramas cíclicos dos eletrodos **Au(111)/CS<sub>2</sub>/Epinefrina** e de **Au(111)/CS<sub>2</sub>/NPs/Epinefrina**, com nanopartículas de 7, 20 e 60 nm, com eletrólito  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0.05 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 1) e  $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ .

De um modo geral, os ensaios realizados na presença de nanopartículas de óxido de ferro mostram que as NP20 e NP60 apresentam valores de recobrimentos superficiais próximos, o que poderá ser explicado pelo facto de as NP60 apresentarem uma significativa dispersão de tamanhos. Verifica-se que com os elétrodo modificados com NP7, apesar da razão elevada entre a área superficial/volume, obtém-se sempre uma menor quantidade de epinefrina adsorvida. Esta diferença pode estar também relacionada com a estequiometria das nanopartículas de óxido de ferro, que, como foi dito anteriormente, depende do seu tamanho <sup>[34]</sup>, alterando o comportamento da ligação do enxofre com as nanopartículas.

**Tabela 3.4** – Valores de potenciais redox ( $E_p$ ), da densidade de corrente ( $i_p$ ) e das quantidades adsorvidas ( $\Gamma$ ) da epinefrina em  $H_2SO_4$  0.05 mol L<sup>-1</sup> e  $v = 50$  mV s<sup>-1</sup>.

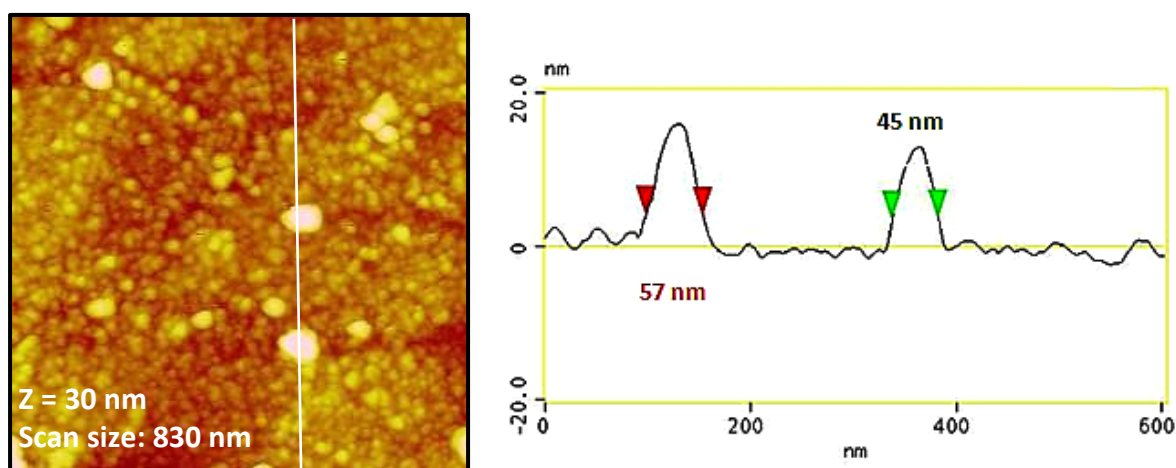
NPs Nm	$E_p^a$	$E_p^c$	$\Delta E_p$	$i^a$	$i^c$	$\Gamma^a / 10^{-10}$	$\Gamma^c / 10^{-10}$
		V		$\mu A\ cm^{-2}$		$mol\ cm^{-2}$	
Sem NPs	0.54	0.49	0.05	18.6	-13.2	1.56	1.37
7	0.54	0.49	0.05	21.1	-19.9	2,01	1.96
20	0.53	0.49	0.04	30.2	-14.3	2.80	2.15
60	0.53	0.49	0.04	25.5	-13.2	2.33	2.10

Este trabalho demonstra que é possível modificar superfícies num só passo utilizando CS<sub>2</sub> e nanopartículas de óxidos de ferro do tipo magnetite de forma a aumentar a área superficial do elétrodo e, deste modo, a quantidade de epinefrina adsorvida.

### 3.3.1 Caracterização morfológica dos elétrodos de ouro modificados com CS<sub>2</sub>, nanopartículas de óxido de ferro e epinefrina

O elétrodo **Au(111)/CS<sub>2</sub>/NP60/Epinefrina** foi caracterizado morfológicamente por AFM (figura 3.21). Verifica-se que a presença de epinefrina e de NPs em solução, juntamente com o CS<sub>2</sub>, conduz a uma morfologia da superfície diferente da obtida para **Au(111)/CS<sub>2</sub>/NP60** (figura 3.8) e, devido à dispersão de tamanhos nas amostras de NP60 antes de qualquer modificação e à pequena dimensão das moléculas de epinefrina, torna-se difícil a identificação de NPs funcionalizadas com epinefrina.

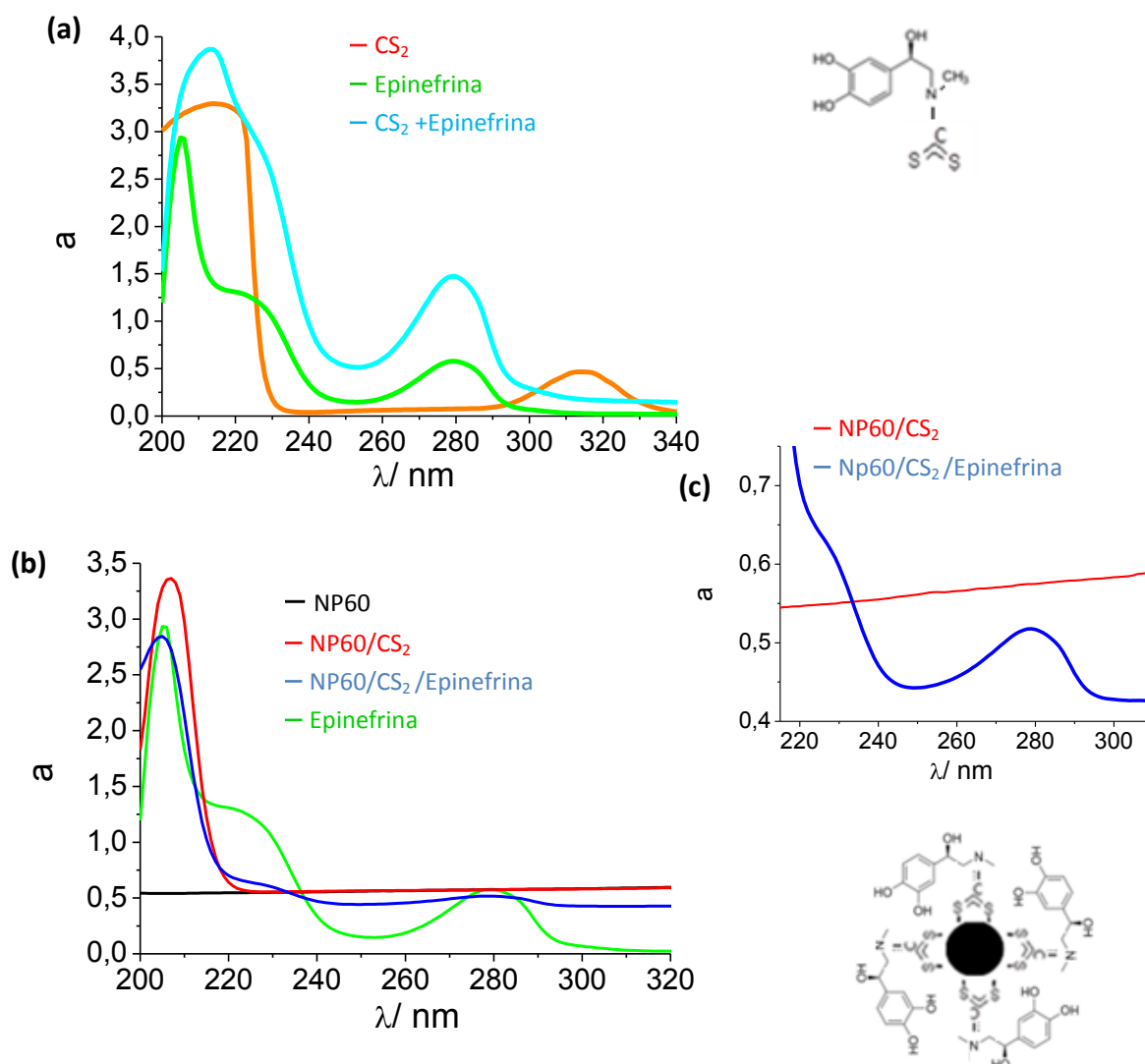
No elétrodo **Au(111)/CS<sub>2</sub>/NP60** as NPs podem interligar-se através do CS<sub>2</sub> formando aglomerados, enquanto que o elétrodo **Au(111)/CS<sub>2</sub>/NP60/Epinefrina** se encontra recoberto por estruturas globulares com diferentes tamanhos (20 – 60 nm), não existindo tanta possibilidade para se estabelecerem ligações entre NPs adjacentes. A epinefrina, ao se ligar ao carbono do CS<sub>2</sub> para formar o ditiocarbamato, irá ocupar espaço físico dificultando a ligação entre as nanopartículas e o enxofre. Devido à espontaneidade do processo de adsorção é ainda possível que exista epinefrina apenas ligada pelo CS<sub>2</sub> sem reação com NPs, o que também contribuirá para o espaçamento visível entre NPs adsorvidas.



**Figura 3.21** - Imagens de AFM da superfície do elétrodo de ouro modificado com CS<sub>2</sub>, nanopartículas de 60 nm e epinefrina.

### 3.4 Caracterização por espectroscopia de UV-Vis de nanopartículas de óxido de ferro funcionalizadas

Tendo como objetivo fulcral a caracterização das nanopartículas de óxido de ferro modificadas, recorreu-se à espectroscopia de UV-Vis para a identificação dos picos do CS<sub>2</sub>, epinefrina e verificar a possível formação de ditiocarbamato por reação de CS<sub>2</sub> e epinefrina. Inicialmente, efetuou-se o estudo das soluções de **CS<sub>2</sub>**, **Epinefrina** e **CS<sub>2</sub>+Epinefrina**, sem NPs, cuja preparação se encontra referida na metodologia experimental (capítulo 2.2.4.1). Na figura 3.22, estão representados os espectros obtidos e na tabela 3.6 encontram-se resumidos os valores de picos com a sua respetiva identificação.



**Figura 3.22** – Espectros de UV-Vis: (a) Em solução sem NPS (b) e (c) Dispersão com NP60.

Pela análise da figura 3.22 (a) verifica-se que o espectro da solução de CS<sub>2</sub> apresenta o pico característico a 315 nm e outro próximo dos 210 nm, tal como anteriormente verificado <sup>[89]</sup>. No espectro da solução de epinefrina são observados três picos (280 nm; 222 nm; 206 nm) que são concordantes com os valores característicos deste composto, ≈ 200 nm, ≈ 280 nm e outro entre 213 – 230 nm <sup>[90]</sup>. O ditiocarbamato apresenta dois picos característicos a 260 e a 290 nm, podendo ambos encontrarem-se desviados consoante a estrutura da cadeia lateral da amina <sup>[46,89]</sup>. No espectro UV-Vis da solução **CS<sub>2</sub>+Epinefrina**, figura 3.22 (a), verifica-se a presença de um pico a 289 nm que se encontra próximo de um dos picos característicos do ditiocarbamato. Embora o pico a 260 nm não seja visível, provavelmente devido a sobreposição com o pico de 280 nm, deixou de se observar o pico a 315 nm pertencente ao CS<sub>2</sub>, mostrando que ocorreu a formação de ditiocarbamato <sup>[89]</sup>.

**Tabela 3.5** – Comprimento de onda dos picos ( $\lambda$ ) obtidos no espectros UV-Vis de cada amostra.

Amostras	$\lambda$ / nm					
CS <sub>2</sub>	315	-	-	-	212	-
Epinefrina	-	-	280	222	-	206
CS <sub>2</sub> + Epinefrina	-	289	280	224	214	206
NP60	(*)					
NP60 + CS <sub>2</sub>	-	-	-	-	207	-
NP60 + CS <sub>2</sub> + Epinefrina	-	288	279	231	205	

(\*) Pelo fato da dispersão de NPs ficar muito escura, optou-se por efetuar um grande número de diluições o que não permite tirar conclusões sobre o espectro das NPs em si. No entanto, este fato não põe em causa a discussão dos espectros.

De forma a estudar as NPs funcionalizadas, traçaram-se espectros de UV-Vis de dispersões de **NP60+CS<sub>2</sub>** e de **NP60+CS<sub>2</sub>+Epinefrina**, tal como descrito anteriormente (ver capítulo 2.2.4.1) que se compararam com os espectros das NPs não funcionalizadas. Pode-se observar que nos espectros das NPs, quando modificadas com **CS<sub>2</sub>**, se observa

um pico a  $\approx 207$  nm, que se encontra ligeiramente desviado relativamente ao pico do CS<sub>2</sub> (211 nm), possivelmente por estar ligado às NPs.

Modificando as NPs com **CS<sub>2</sub>+Epinefrina** são identificados vários picos, figuras 3.22 (b) e (c) e tabela 3.6. O pico a 288 nm é atribuído à formação do ditiocarbamato, e os restantes (279 nm; 231 nm; 205 nm) encontram-se em concordância com os resultados obtidos para a epinefrina em solução.

Com base neste estudo, pode-se deduzir que ocorreu a formação de ditiocarbamato pelo que a funcionalização das NPs foi bem sucedida.



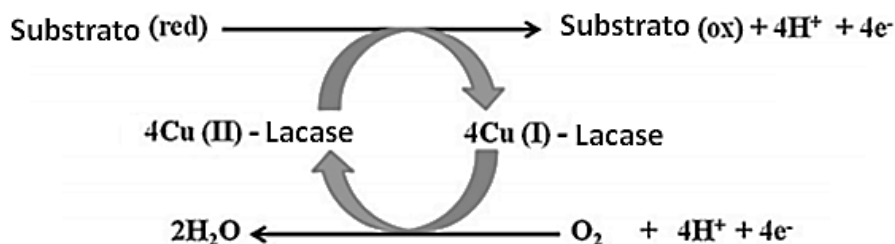
## **Capítulo 4:**

Eléttodos modificados com CS<sub>2</sub> e nanopartículas de  
óxido de ferro para o desenvolvimento de  
biossensores enzimáticos



No capítulo 3 confirmou-se que é possível imobilizar simultaneamente NPs e epinefrina, sendo agora testada a imobilização e a atividade do enzima lacase através da conjugação entre o CS<sub>2</sub> e as NPs num elétrodo de Au(111).

O enzima lacase é um oxidoreductase com quatro centros de cobre, classificados como sendo do tipo T1 (mononuclear), e T2/T3 (conjunto trinuclear). Através de interações hidrofóbicas, o enzima catalisa a oxidação de substratos fenólicos por perda de um eletrão, e em paralelo, ocorre a redução de oxigénio molecular a água. A redução do oxigénio é de extrema importância, pois tem a função de regenerar a forma ativa do enzima (figura 4.1) <sup>[50,51]</sup>. Assim, ao oxidar o substrato, o cobre T1 do enzima passa do seu estado de oxidação Cu(II) a Cu(I). De seguida, ocorre uma transferência eletrónica interna do cobre T1 (recuperando o seu estado de oxidação Cu(II)), para o cobre T2 e T3, responsáveis pela redução molecular do oxigénio a água. O oxigénio, ao ser reduzido, irá regenerar o estado de oxidação do cobre T2/T3, e portanto, do enzima <sup>[51]</sup>.

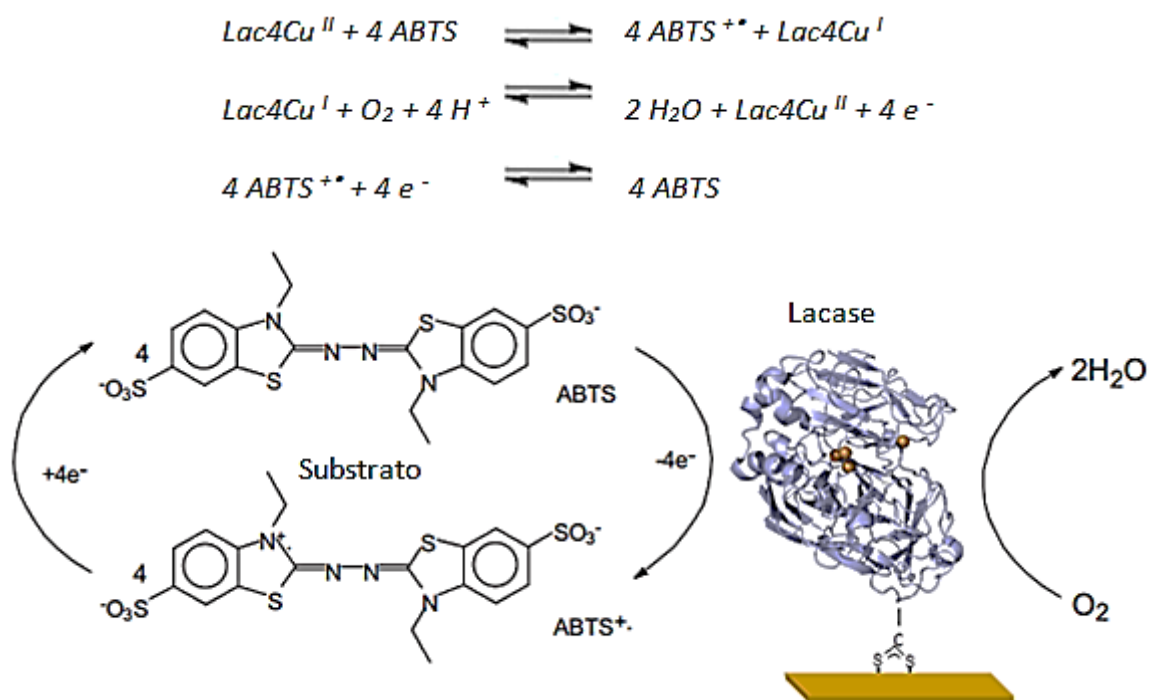


**Figura 4.1** – Mecanismo geral da ação da lacase (figura adaptada <sup>[51]</sup>).

Muitos compostos orgânicos atuam como substrato para a lacase, sendo o ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico), (ABTS) um dos compostos fenólicos mais estudados para testar a atividade do enzima, devido à sua disponibilidade, baixo custo e ainda por não ser tóxico.

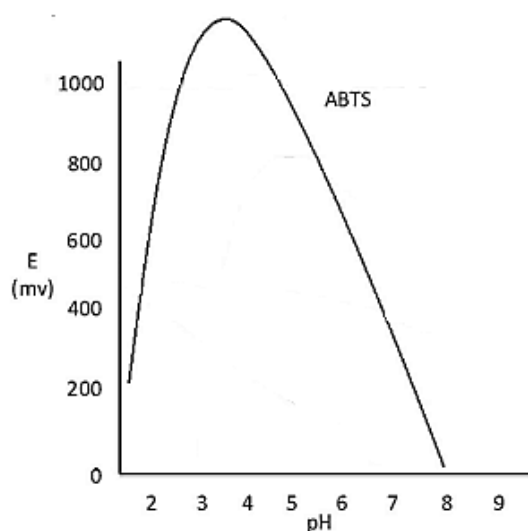
O comportamento eletroquímico do ABTS num elétrodo de carbono, em solução tampão citrato (pH 4), apresenta dois processos redox <sup>[91]</sup>, sendo que o primeiro corresponde à oxidação do ABTS no seu catião radical (ABTS<sup>•+</sup>),  $E_{1/2} = 0.52$  V vs SCE, e o segundo à oxidação do catião radical a um dicatão (ABTS<sup>2+</sup>),  $E_{1/2} = 0.93$  V vs SCE. Na presença da lacase, o ABTS, oxidado pelo enzima, é depois reduzido na superfície do elétrodo (que está a um potencial adequado para esta reação), sendo este o processo

eletroquímico utilizado para a detecção da atividade catalítica do enzima. Assim, e tal como ilustrado no esquema reacional apresentado na figura 4.2, verifica-se que a reação de oxidação do ABTS ocorre acoplada com a redução do oxigénio, num processo em que ocorre a transferência de 4 eletrões <sup>[92-94]</sup>.



**Figura 4.2** – Representação esquemática das reações envolvidas na atividade catalítica da lacase na presença de ABTS (figura adaptada <sup>[95]</sup>).

Ying Liu *et al.* <sup>[96]</sup> reportaram um estudo que avalia a influência do pH na atividade enzimática da lacase para a oxidação do ABTS e verificaram que a corrente catódica diminui com o aumento do pH. Deste modo, concluíram que o elétrodo contendo lacase apresenta uma atividade ótima entre os valores de pH 4 e 6, não se observando resposta catalítica a pH 7 (figura 4.3) <sup>[63-65]</sup>. Tendo em conta estes estudos, os ensaios experimentais da atividade catalítica da lacase foram efetuados a pH 4.6.

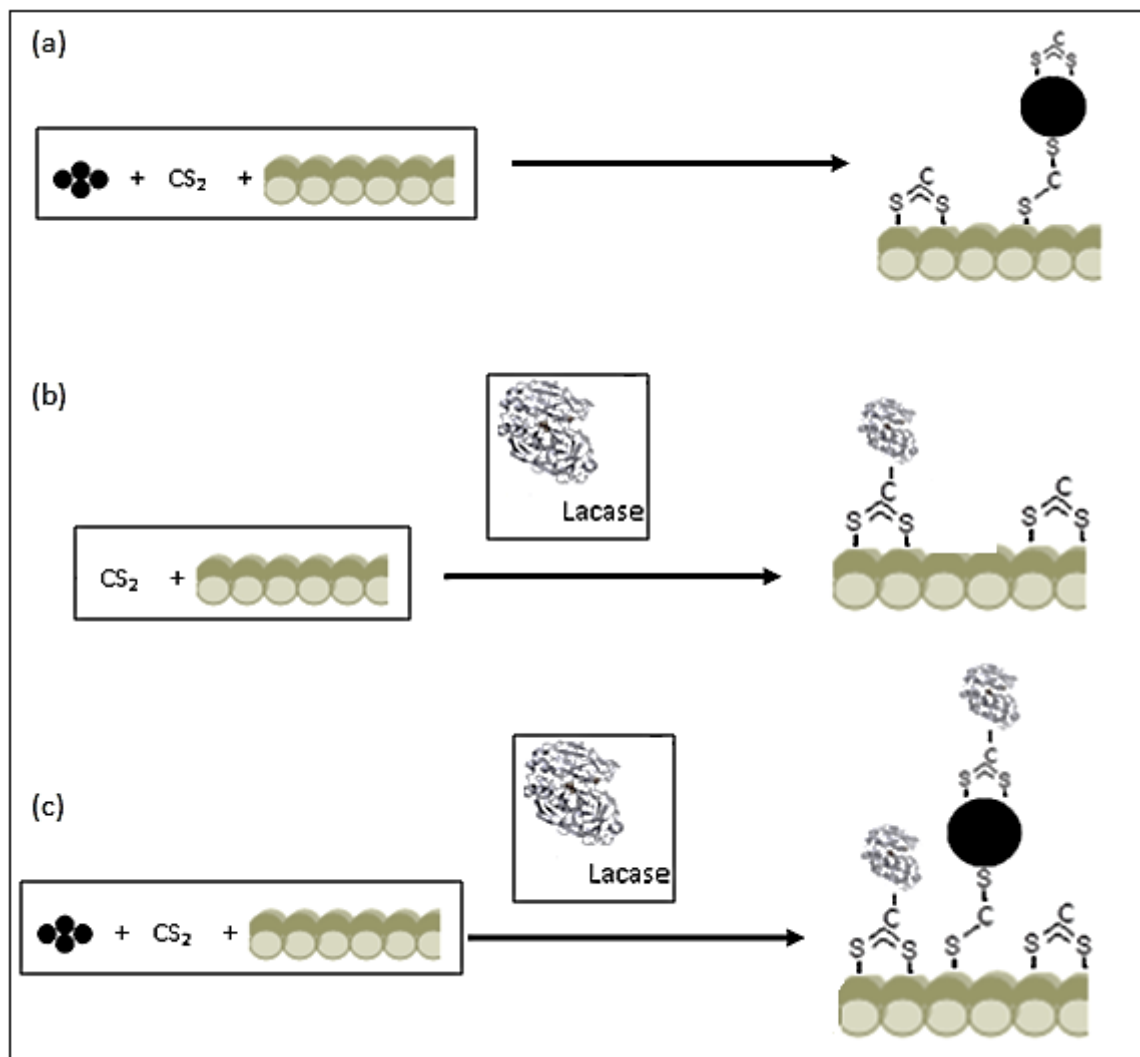


**Figura 4.3** – Tendência esperada para a atividade do enzima lacase em função do pH na presença do substrato ABTS (figura adaptada <sup>[65]</sup>).

Considerando as reações envolvidas na atividade catalítica da lacase na presença de ABTS referidas anteriormente, um dos objetivos deste trabalho, foi o estudo do comportamento eletroquímico da lacase quimicamente adsorvida com CS<sub>2</sub>, utilizando nanopartículas de óxido de ferro, num elétrodo Au(111). Este estudo foi realizado por voltametria cíclica e cronoamperometria, em soluções arejadas e a um pH 4.6, fatores importantes para a detecção da atividade do enzima.

## 4.1 Estudos eletroquímicos

Neste estudo realizaram-se ensaios eletroquímicos em elétrodos modificados: **Au(111)/CS<sub>2</sub>/NPs**, **Au(111)/CS<sub>2</sub>/Lacase**, e **Au(111)/CS<sub>2</sub>/NPs/Lacase** (utilizando nanopartículas com tamanhos médios de 20 e 60 nm), preparados de acordo com o esquema da figura 4.4.

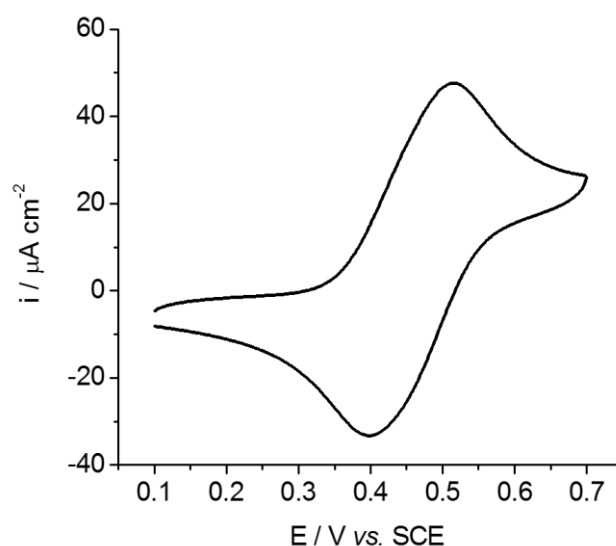


**Figura 4.4** - Metodologia utilizada para a modificação da superfície do Au(111): (a) **Au(111)/CS<sub>2</sub>/NPs**; (b) **Au(111)/CS<sub>2</sub>/Lacase**; (c) **Au(111)/CS<sub>2</sub>/NPs/Lacase**.

Como foi referido anteriormente, o pH ótimo do enzima lacase encontra-se entre os valores 4 e 6, sendo por isso utilizado nestes estudos o eletrólito tampão citrato-fosfato (pH 4.6). Conhecendo o comportamento do ABTS e sabendo que o seu produto de oxidação é o catião radical (ABTS<sup>•+</sup>) ( $E_{1/2} = 0.52$  V vs SCE), os ensaios serão executados na gama de potencial entre 0 e 0.6 V.

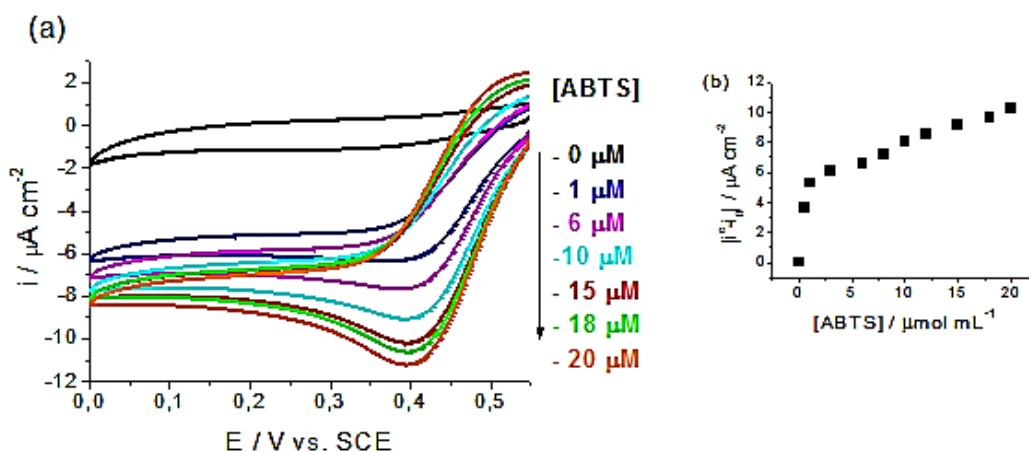
Foram realizados diferentes ensaios utilizando a voltametria cíclica e a cronoamperometria, de forma a estudar o comportamento do enzima. As preparações dos elétrodos e os detalhes experimentais foram descritos no capítulo 2.1.4.

Através da técnica de voltametria cíclica, fez-se um estudo de forma a conhecer a atividade catalítica do enzima lacase. Começou-se por avaliar o comportamento eletroquímico do substrato ABTS em ouro limpo. A partir da figura 4.5 é possível verificar que o ABTS apresenta um processo de oxidação/redução reversível, com valores de  $E_{1/2} = 0.45 \text{ V}$ ,  $i_p^a \approx 50 \mu\text{A cm}^{-2}$  e  $i_p^c \approx -50 \mu\text{A cm}^{-2}$ . Este processo deverá corresponder à formação do par redox  $\text{ABTS}/\text{ABTS}^{+\bullet}$ , de acordo com o descrito anteriormente <sup>[92-94]</sup>.



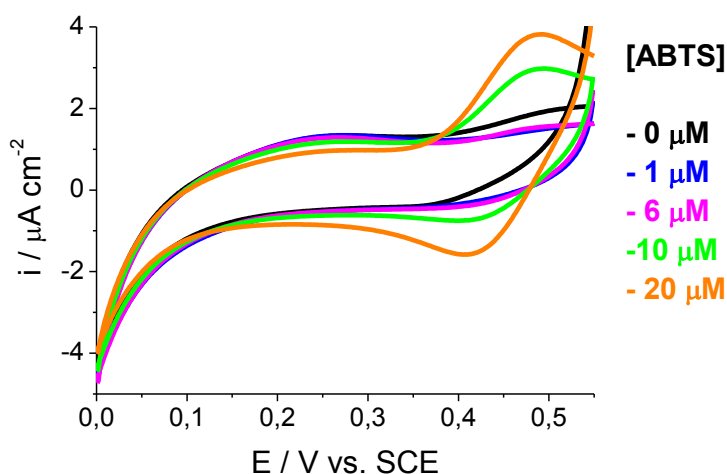
**Figura 4.5** - Voltamograma cíclico de  $0.5 \text{ mmol L}^{-1}$  ABTS,  $50 \text{ mV s}^{-1}$  em  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  PB-Cit (pH 4.5) <sup>[47]</sup>.

Realizou-se de seguida um ensaio utilizando um elétrodo de ouro limpo numa solução contendo o enzima lacase, à qual se adicionou ABTS progressivamente, tendo como objetivo verificar se o enzima apresenta atividade catalítica nas condições experimentais estudadas. Pelos resultados apresentados na figura 4.6 é possível verificar que à medida que se adiciona ABTS, observa-se um aumento do processo de redução, com valores de intensidades de correntes bastante superiores às de oxidação. O aumento da intensidade dos picos de redução ( $E_p^c = 0.41 \text{ V}$ ) demonstram a atividade catalítica do enzima nestas condições (pH, intervalo de potencial e concentração de ABTS) indicando que o enzima está ativo em solução e que oxida o ABTS. A figura 4.6 (b) mostra a variação da corrente com o aumento da concentração do ABTS.



**Figura 4.6** - (a) Voltamogramas cíclicos do eletrodo **Au(111)** em 0.1 mol L<sup>-1</sup> PB-Cit (pH 4.6) com 1 mg mL<sup>-1</sup> lacase e com adição de ABTS [0 - 20 μmol L<sup>-1</sup>],  $v = 5 \text{ mV.s}^{-1}$ ; (b) Representação gráfica de  $|i^c - i_o|$  vs [ABTS].

Na figura 4.7 apresenta-se o comportamento do eletrodo Au(111) modificado com **CS<sub>2</sub>/NP20**, na ausência do enzima. Tal como esperado, verifica-se que na ausência de enzima, o eletrodo não apresenta atividade catalítica. Esta conclusão é deduzida pelo fato de ambos os picos redox mostrarem um crescimento semelhante à medida que se adiciona o ABTS, que é um composto eletroativo, e que sofre um processo de oxidação/redução com características reversíveis na superfície do eletrodo. Assim, à medida que se aumenta a sua concentração em solução, as correntes anódicas e catódicas sofrem um incremento semelhante, obedecendo à equação de Randles Sevcik <sup>[56]</sup>.



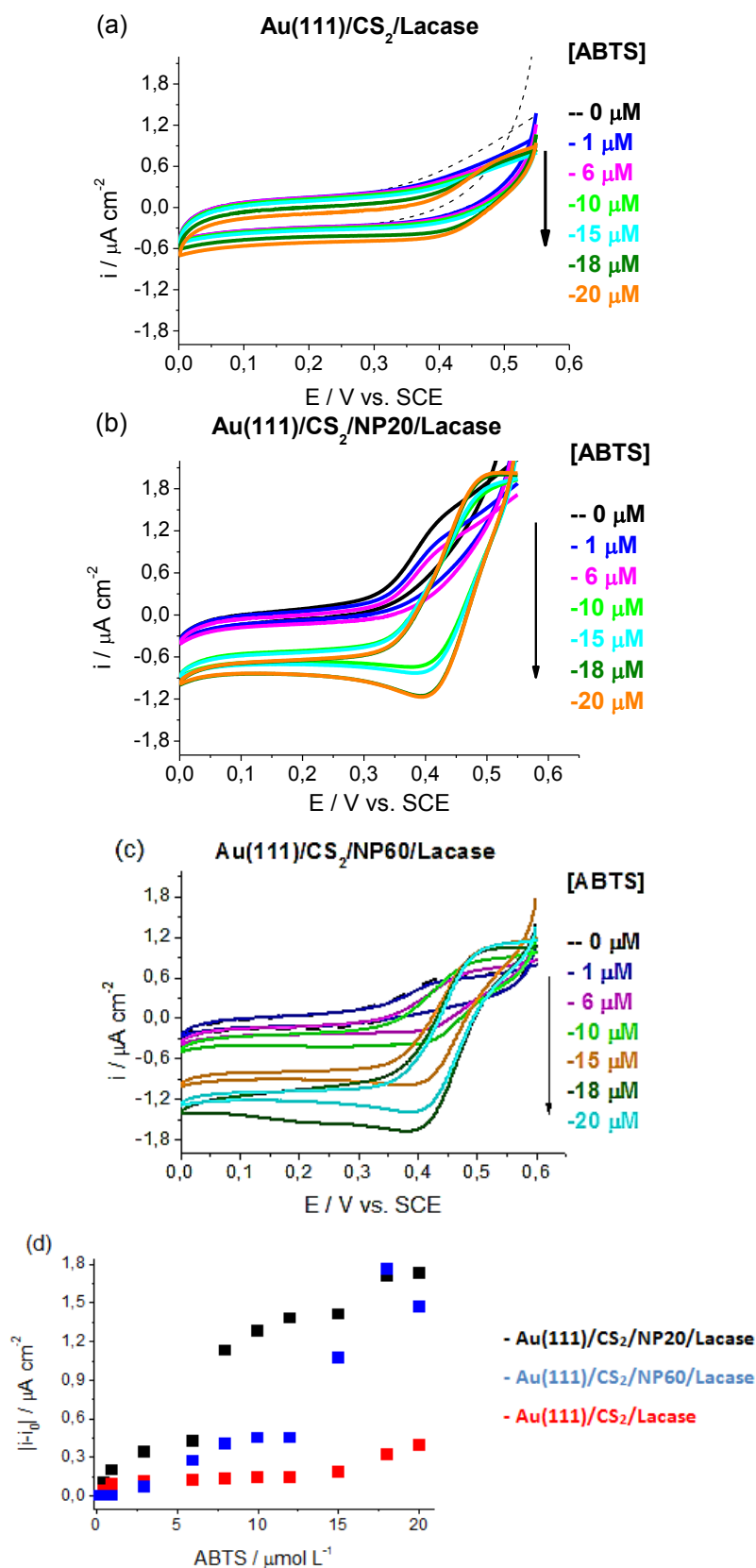
**Figura 4.7** – Voltamogramas cíclicos do eletrodo **Au(111)/CS<sub>2</sub>/NP20** com a adição de ABTS [0 - 20 μmol L<sup>-1</sup>], 0.1 mol L<sup>-1</sup> PB-Cit (pH 4.6) e  $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$ .

Após a confirmação da atividade catalítica do enzima em solução, estudou-se a imobilização da lacase, modificando o eletrodo de ouro com **CS<sub>2</sub>/Lacase** e



**CS<sub>2</sub>/NPs/Lacase**. No estudo referente ao eléctrodo contendo **CS<sub>2</sub>/Lacase**, figura 4.8 (a), apenas se detetou algum incremento na intensidade de corrente de redução sem o correspondente aumento da corrente de oxidação a partir de 15  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . No entanto, os voltamogramas obtidos para **CS<sub>2</sub>/NPs/Lacase**, figura 4.8 (b) e (c), onde se utilizaram as nanopartículas de 60 e 20 nm, respetivamente, mostram atividade catalítica notória do enzima. Observou-se que na presença das NPs, as correntes aumentam a partir de concentrações muito mais baixas de ABTS (0.5  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ), provando que as NPs apresentam um papel importante na deteção do sinal. Na figura 4.8, é visível que a partir da concentração 18 - 20  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , ocorre uma diminuição do pico de redução, o que se pode dever ao facto de que, para além do enzima poder estar saturado, o eléctrodo poder estar coberto com ABTS, e assim, não se conseguir detetar o sinal eletroquímico após a adição de mais substrato.

Comparando os eléctrodos modificados com **CS<sub>2</sub>/Lacase** e **CS<sub>2</sub>/NPs/Lacase** (figura 4.8 d), verifica-se que apesar de se observar um comportamento catalítico mais notório e densidades de corrente superiores nos eléctrodos contendo NPs, principalmente na presença de NP20, os resultados foram pouco reprodutíveis. A falta de reprodutibilidade pode ser devida a vários fatores, tais como: reduzida atividade do enzima comercial, dificuldade em preparar eléctrodos com massas de NPs/enzima iguais, e ainda, ao facto da corrente de redução não estar completamente estabilizada quando obtida por voltametria cíclica. No entanto, verificou-se que o enzima apresenta atividade biológica após ligação covalente com o CS<sub>2</sub>, sendo os resultados obtidos com as nanopartículas muito mais promissores do que os resultados obtidos utilizando apenas o enzima ligada ao CS<sub>2</sub>. É sabível que a elevada densidade eletrónica dos eléctrodos de ouro podem desnaturar os enzimas que se encontram adsorvidos à sua superfície <sup>[21]</sup>. O fato de se ter nanopartículas de óxido de ferro a ligar os enzimas, promovendo assim a catálise, evidencia o potencial desta metodologia na preparação de biossensores.

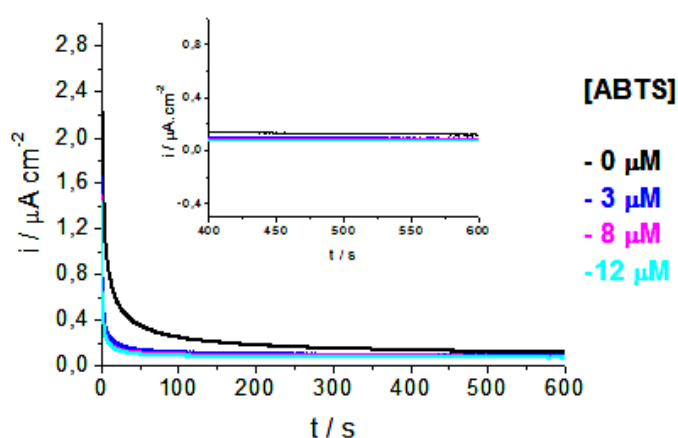


**Figura 4.8** – Voltamogramas cíclicos dos elétrodos: (a) **Au(111)/CS<sub>2</sub>/Lacase**, (b) **Au(111)/CS<sub>2</sub>/NP20/Lacase** e (c) **Au(111)/CS<sub>2</sub>/NP60/Lacase** com adição de ABTS [0 - 20  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ], em 0.1 mol L<sup>-1</sup> PB-Cit (pH 4.6) e  $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$ ; (d) Representação gráfica de  $|i - i_0|$  vs [ABTS].

Para comprovar a atividade do enzima, foram ainda realizados estudos por cronoamperometria, sendo esta técnica muito utilizada na transdução eletroquímica de biossensores.

Nesta técnica, aplica-se um potencial constante, durante um certo período de tempo, adequado à redução do substrato que tenha sido oxidado pela lacase, permitindo a determinação da atividade catalítica do enzima. Como resultado, verifica-se que à medida que se adiciona o ABTS e este é oxidado pelo enzima imobilizado, ocorre um aumento na corrente de redução, detetado pelo elétron.

Previamente ao estudo da atividade catalítica por cronoamperometria, preparou-se um elétron de **Au(111)/CS<sub>2</sub>/NP60** e ao longo da experiência foram adicionados diferentes volumes de ABTS. A partir dos resultados apresentados na figura 4.9, verifica-se que não ocorre um aumento significativo da corrente de redução, não se observando portanto um comportamento catalítico, confirmando que não se observa atividade catalítica quando não se encontram presentes os enzimas em solução ou imobilizados no elétron.



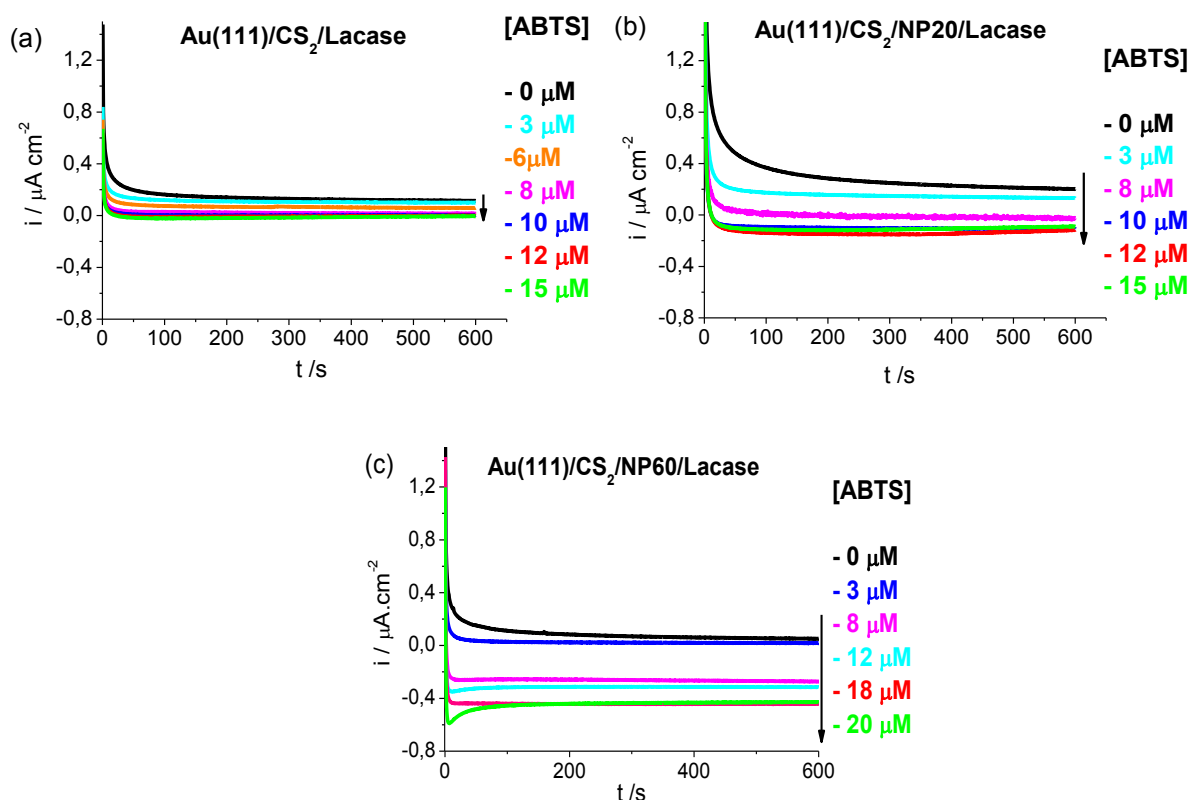
**Figura 4.9** — Cronoamperogramas do elétron **Au(111)/CS<sub>2</sub>/NP60**, durante 600 s, a 0.41 V e em 0.1 mol L<sup>-1</sup> PB-Cit (pH 4.6) com a adição de ABTS [0 - 12  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ].

Utilizando a técnica de cronoamperometria, estudaram-se elétrons com o enzima lacase, imobilizado nas suas superfícies, na ausência e presença de NPs, **CS<sub>2</sub>/Lacase** e **CS<sub>2</sub>/NPs/Lacase**, respetivamente, tendo sido utilizadas as nanopartículas de 20 e 60 nm. Aplicando o potencial de 0.41 V durante 600 s, obtiveram-se os cronoamperogramas representados na figura 4.10.

Na figura 4.10 (a), verifica-se que o elétron modificado com **CS<sub>2</sub>/Lacase** (sem NPs) atinge o pico de redução máximo entre 8 e 10  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de ABTS, apresentando uma

densidade de corrente máxima de  $0.11 \mu\text{A cm}^{-2}$ . Este resultado indica que o enzima apresenta atividade catalítica quando ligado ao  $\text{CS}_2$ .

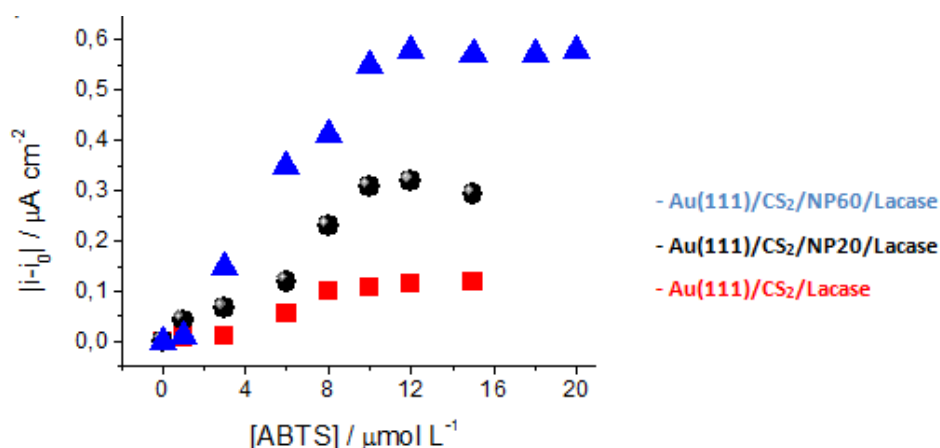
Nas figuras 4.10 (b) e (c), referentes aos elétrodos de ouro modificados com  $\text{CS}_2/\text{NPs}/\text{Lacase}$ , é possível observar uma maior atividade do enzima. Relacionando o elétrodo contendo NP20 ( $i_{\text{max}} = 0.33 \mu\text{A cm}^{-2}$ ) com o elétrodo contendo NP60 ( $i_{\text{max}} = 0.58 \mu\text{A cm}^{-2}$ ), verifica-se que se observa uma densidade de corrente mais elevada para NP60, e que ambos saturam à mesma concentração de ABTS,  $12 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Assim, neste caso, verifica-se que as interfaces apresentam uma gama linear de  $1 \times 10^{-7}$  a  $1.2 \times 10^{-6} \mu\text{mol L}^{-1}$ , para o ABTS. Estes resultados devem-se à presença das nanopartículas de óxido de ferro, que, estando quimicamente adsorvidas, ampliam a área superficial do elétrodo, aumentando a quantidade de enzimas adsorvidos. O facto de os enzimas estarem ativos comprova a biocompatibilidade das NPs e a sua capacidade de transferência eletrónica.



**Figura 4.10** - Cronoamperogramas dos elétrodos: (a)  $\text{Au(111)/CS}_2/\text{Lacase}$ , (b)  $\text{Au(111)/CS}_2/\text{NP20/Lacase}$  e (c)  $\text{Au(111)/CS}_2/\text{NP60/Lacase}$  com a adição de ABTS  $[0 - 20 \mu\text{mol L}^{-1}]$ , durante 600 s em  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  PB-Cit (pH 4.6).

Os resultados aqui obtidos estão de acordo com os estudos de Liuqing Yang *e. al.* que descreveram as resistências e as correntes na presença e ausência de nanopartículas de óxido de ferro, modificando o eletrodo de platina com o enzima glucose oxidase (GOX) e quitosano (CH). Através de espectroscopia eletroquímica de impedância, verificaram que um eletrodo de platina limpo apresenta uma resistência à transferência de carga de 137  $\Omega$ . Ao modificar esse eletrodo apenas com CH observaram um aumento da resistência (458  $\Omega$ ), sendo que na presença de nanopartículas de óxido de ferro, **Pt/GOX/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/CH**, ocorreu uma diminuição da resistência (217  $\Omega$ ). Deste modo, concluíram que as NPs aumentam a eficiência da transferência eletrônica. Através de voltametria cíclica, verificaram que a resposta da corrente do eletrodo contendo **Pt/GOX/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/CH** é sete vezes mais elevada comparando com o eletrodo que não contém Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, **Pt/GOX/CH** [29].

Fazendo a comparação da modificação dos eletrodos, com e sem NPs (figura 4.11), verifica-se que na presença das NPs o enzima lacase satura a concentrações ligeiramente superiores e com uma maior densidade de corrente, enquanto que na ausência das NPs, começa a ser proeminente o aumento do pico de redução com uma concentração de 6  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de ABTS, obtendo uma gama linear de  $6 \times 10^{-7}$  a  $9 \times 10^{-7} \mu\text{mol L}^{-1}$ .



**Figura 4.11** — Representação gráfica de  $|i - i_0|$  vs concentração de ABTS dos cronoamperogramas da figura 4.10.

Como já foi referido anteriormente, um dos objetivos da utilização de nanopartículas é a obtenção de biossensores com maior sensibilidade, de forma a terem

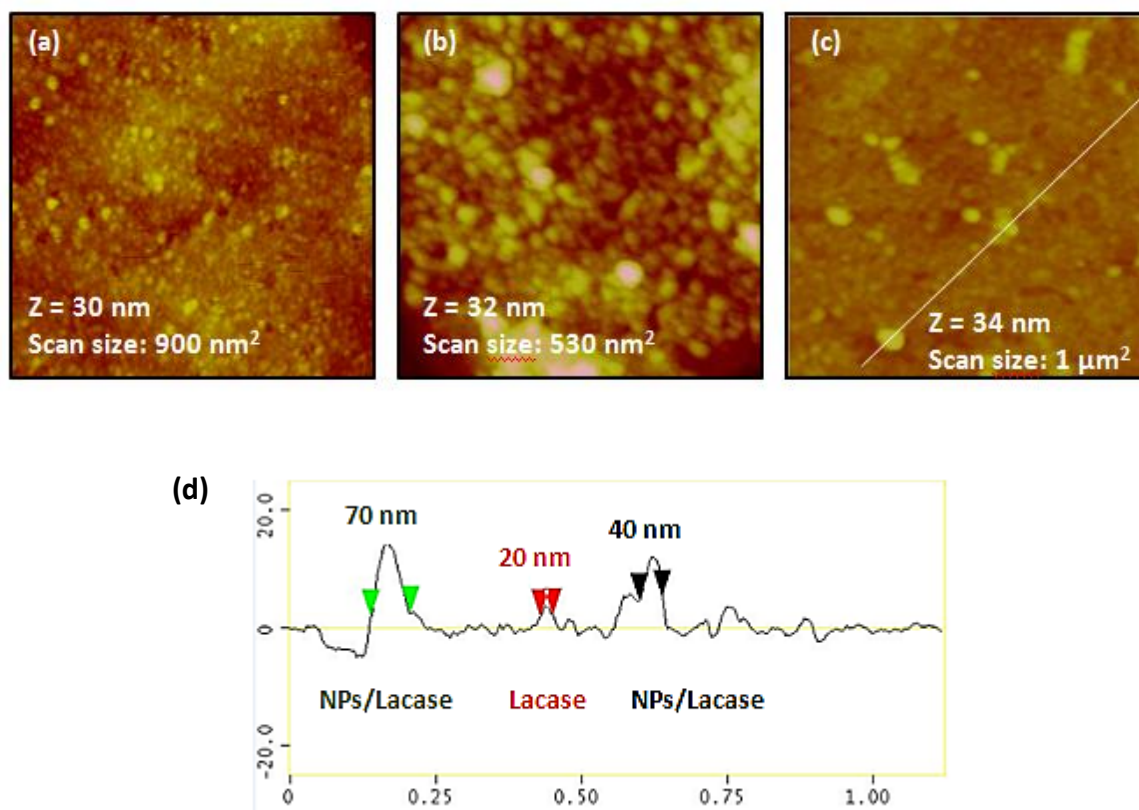
capacidade para analisar amostras reais <sup>[26]</sup>. Ao longo do tempo, foram desenvolvidos alguns biossensores contendo lacase, na ausência de nanopartículas. Vianello *et al.* <sup>[63]</sup> desenvolveram um biossensor com uma gama linear de  $1 \times 10^{-7}$  a  $2 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> e Jarosz-Wilkolazka *et al.* <sup>[97]</sup> um biossensor com o limite de detecção de  $1 \times 10^{-6}$  a  $1 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>, ambos para a hidroquinona.

Alguns autores exploraram biossensores contendo nanopartículas de óxido de ferro, como é o caso de Yi Zhang *et al.* <sup>[98]</sup>. Estes utilizaram um eléctrodo de pasta de carbono sólido onde, por aplicação de um campo magnético, depositaram as NPs revestidas com sílica e conjugaram com lacase. Verificaram que a resposta da corrente aumenta linearmente com a concentração da hidroquinona, num intervalo de  $1 \times 10^{-7}$  a  $1,375 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>.

Com os resultados obtidos neste trabalho e apesar de ainda não totalmente explorados, mostram que se poderão utilizar estas nanopartículas (de tipo magnetite) funcionalizadas com CS<sub>2</sub> no desenvolvimento de um biossensor contendo lacase com transdução eletroquímica.

#### **4.1.1 Caracterização morfológica dos eléctrodos de ouro modificados com CS<sub>2</sub>, lacase e nanopartículas de óxido de ferro**

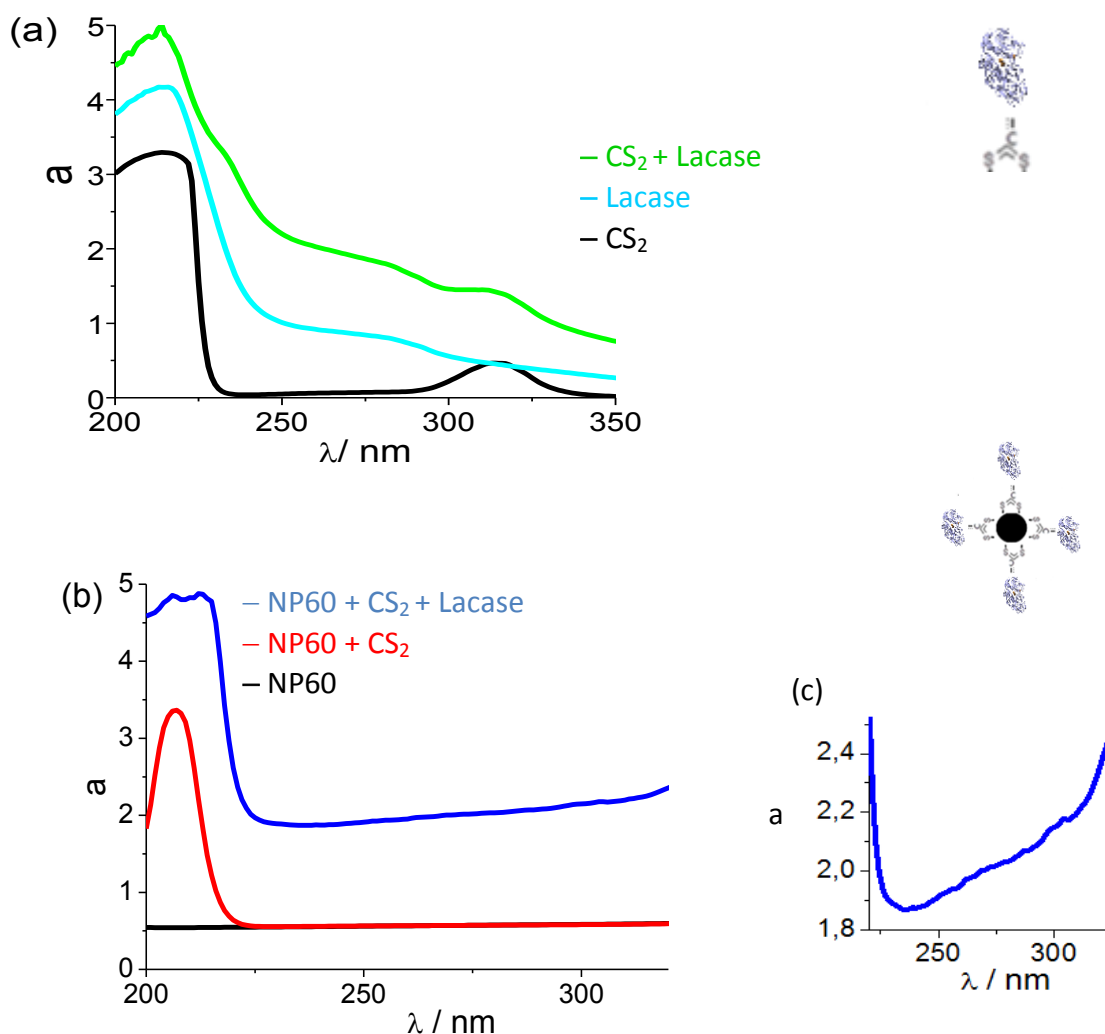
Foi efetuada uma análise morfológica, através da microscopia de força atómica, aos eléctrodos modificados com CS<sub>2</sub> e lacase, na presença e ausência das NPs. Pela observação das imagens obtidas e apresentadas na figura 4.12, pode-se afirmar que o ouro se encontra totalmente coberto. Na imagem da figura 4.12 (a) é possível deduzir que ocorreu a imobilização da lacase após reação com CS<sub>2</sub> sobre a superfície do ouro, visto que toda a superfície do eléctrodo de ouro se encontra uniformemente coberta com moléculas do enzima. As imagens da figura 4.12 (b) e (c) correspondem ao eléctrodo de ouro modificado com CS<sub>2</sub>, NP60 e enzima lacase, **CS<sub>2</sub>/NP60/Lacase**, sendo também possível observar que a superfície do eléctrodo se encontra totalmente coberta com estruturas globulares de dimensões dispersa (20 -70 nm), caso em que não se consegue distinguir o enzima lacase das nanopartículas.



**Figura 4.12** – Imagem de AFM da superfície do eletrodo de ouro modificado com lacase. (a) Au(111)/CS<sub>2</sub>/Lacase, (b) e (c) Au(111)/CS<sub>2</sub>/NP60/Lacase. (d) Análise de secção da figura (c).

## 4.2 Caracterização por espectroscopia de UV-Vis de nanopartículas de óxido de ferro funcionalizadas com lacase

Foram realizados estudos por espectroscopia de UV-Vis de forma a identificar os picos do CS<sub>2</sub> e lacase e a formação de ditiocarbamato, sendo este último formado a partir da reação entre o CS<sub>2</sub> e a amina da lacase. Na figura 4.13, encontram-se representados os espectros de UV-Vis das diversas soluções e na tabela 4.1 foram resumidos os valores das bandas de absorção com a sua respetiva identificação. Os detalhes das preparações das soluções e das dispersões foram referidas no capítulo 2.2.4.1.



**Figura 4.13** – Espectros de UV-Vis: (a) Em solução (b) Dispersão com NPs (c) NP60+ $\text{CS}_2$ +Lacase.

Na figura 4.13 (a), apresenta-se o espectro UV-Vis da solução de  $\text{CS}_2$ , onde se observam os picos correspondentes ao  $\text{CS}_2$  (315 nm; 212 nm) <sup>[89]</sup>, como já foi referido anteriormente (capítulo 3). A lacase é uma proteína constituída por diversos aminoácidos sendo a fenilalanina, o triptofano e a tirosina os mais importantes porque, devido ao seu sistema de ligações duplas, são estes que absorvem no UV-Vis originando um pico característico a  $\approx 280$  nm <sup>[99]</sup>. Verificou-se que o espectro obtido para a lacase em solução, mostra a presença de uma banda de absorção a  $\approx 281$  nm. Como já foi anteriormente referido, o espectro de UV-Vis de ditiocarbamato apresenta dois picos característicos a 260 e a 290 nm, podendo ser observados alguns desvios a estes valores,



consoante a estrutura da cadeia lateral <sup>[89,46]</sup>. Na solução contendo **CS<sub>2</sub> + Lacase**, figura 4.13 (a), verifica-se a presença de dois picos a 290 e 259 nm que se encontram a valores coincidentes com os das bandas características do ditiocarbamato. Também se verifica que a banda de absorção que identifica o CS<sub>2</sub> (214 nm) diminui, demonstrando que o CS<sub>2</sub> é consumido e que, deste modo, ocorre a formação do ditiocarbamato <sup>[89]</sup>.

**Tabela 4.1** - Valores de comprimento de onda ( $\lambda$ ) dos picos detetados nos espectros de UV-Vis das várias amostras.

Solução/dispersão	$\lambda$ /nm						
<b>CS<sub>2</sub></b>	315	-	-	-	-	212	-
<b>Lacase</b>	-	-	282	-	-	215	-
<b>CS<sub>2</sub> + Lacase</b>	315	290	282	259	233	214	-
<b>NP60</b>	(*)						
<b>NP60 + CS<sub>2</sub></b>	-	-	-	-	-	-	207
<b>NP60 + CS<sub>2</sub> + Lacase</b>	-	291	282	259	234	212	206/210

(\*) Pelo fato da dispersão de NPs ficar muito escura, optou-se por efetuar um grande número de diluições o que não permite tirar conclusões sobre o espectro das NPs em si. No entanto, este fato não põe em causa a discussão dos espectros.

Foram também preparadas dispersões contendo **NP60 + CS<sub>2</sub>** e **NP60 + CS<sub>2</sub> + Lacase**, tal como anteriormente referido (capítulo 2.2.4.1), de forma a se poder caracterizar as NPs funcionalizadas. Como já foi verificado anteriormente, nos espectros de UV-Vis de dispersões de NPs quando modificadas com CS<sub>2</sub>, observa-se um pico a 207 nm (capítulo 3.4), característico do CS<sub>2</sub>. As NPs funcionalizadas com **CS<sub>2</sub> + Lacase** apresentam dois picos muito mal definidos, figura 4.13 (b), atribuídos ao ditiocarbamato (296 nm; 260 nm), que se encontram em concordância com os esperados, apesar do pico a 296 nm apresentar um ligeiro desvio. Neste caso, tal como observado no capítulo 3.4, também se verifica que é possível a funcionalização das NPs, ocorrendo a formação de ditiocarbamato através da reação entre CS<sub>2</sub> e lacase, figura 4.13 (b) e (c).



## **Capítulo 5:**

Conclusão e perspectivas



No trabalho desenvolvido nesta dissertação explorou-se a (bio)funcionalização de nanopartículas de óxido de ferro de tipo magnetite com potencial aplicação em biossensores. Com esse objetivo, utilizaram-se nanopartículas de óxido de ferro com tamanhos médios de 7, 20 e 60 nm, previamente preparadas e caracterizadas. Através das imagens obtidas por AFM e TEM foi possível confirmar o tamanho médio das partículas, embora se tenha observado uma dispersão de tamanho relativamente elevada, principalmente para o caso das partículas maiores. A imobilização das nanopartículas, em substrato de ouro, foi efetuada num só passo, recorrendo ao dissulfureto de carbono em meio aquoso, que permite estabelecer uma ligação forte dos dois átomos de enxofre, um com a superfície de ouro, e o outro com as nanopartículas.

Na presença de nanopartículas, o eléctrodo modificado, **Au(111)/CS<sub>2</sub>/NPs**, apresenta um processo redox,  $E_{1/2} = 0.4$  V vs. SCE, cujos picos são atribuídos à oxidação da magnetite (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>). O estudo da corrente de pico (especialmente o anódico) em função da velocidade de varrimento apresenta uma resposta linear confirmando que as espécies eletroativas encontram-se adsorvidas de um modo estável na superfície do ouro. Esta nova metodologia de modificação de superfícies foi comparada à imobilização das nanopartículas com uma monocamada auto-montada de hexanoditiol, tendo-se verificado um processo redox melhor definido com o CS<sub>2</sub>. Este resultado é explicado pelo facto do espaçamento entre a nanopartícula e o eléctrodo de ouro ser menor no caso do CS<sub>2</sub>, quando comparado com uma cadeia de seis átomos de carbono.

Os resultados obtidos por *Drop Casting* indicam que as nanopartículas fisicamente adsorvidas no eléctrodo apresentam apenas uma corrente capacitiva, enquanto que, quando ligadas com CS<sub>2</sub>, exibem uma corrente faradaica, indicativa do processo de oxidação da magnetite.

Imobilizou-se com sucesso, e também num só passo, epinefrina numa superfície de ouro contendo CS<sub>2</sub> e nanopartículas. Confirmou-se que a epinefrina imobilizada no eléctrodo apresenta picos redox reversíveis e simétricos, tanto a pH 7 como a pH 4.6 e pH 1, com valores de  $\Delta E_p$  entre 0.07 V e 0.04 V, inferiores aos obtidos para o processo redox da epinefrina em solução ( $\Delta E_p = 0.09$  V). Através da resposta linear entre as correntes anódica e catódica e as velocidades de varrimento utilizadas, concluiu-se que a epinefrina se encontra adsorvida no eléctrodo. A epinefrina em solução de pH = 7, apresenta um comportamento irreversível não se observando o pico de redução, devido à instabilidade

do produto oxidado. Quando a epinefrina se encontra imobilizada, via CS<sub>2</sub> e na presença de nanopartículas de óxido de ferro, verifica-se que o seu comportamento eletroquímico, nestas condições experimentais, é reversível. Conclui-se, pois, que a reacção entre o CS<sub>2</sub> e a amina deverá ocorrer, com a formação de um ditiocarbamato, impedindo deste modo a ciclização da epinefrina.

Finalmente, é de realçar que, na presença das NPs, a quantidade adsorvida de epinefrina aumenta consideravelmente, tendo-se obtido o melhor resultado a pH 1 ( $2.15 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$  vs.  $1.56 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$ ), condição a que a conversão redox da epinefrina é mais favorável. Verificou-se ainda que é possível detetar os processos redox correspondentes à epinefrina e às NPs, num eléctrodo modificado com ambas as espécies, especialmente a pH 7. Estes resultados demonstram a potencialidade destas superfícies funcionalizadas como sensores de pH, dado que o o comportamento redox das NPs não se altera significativamente com o pH da solução, enquanto que o da epinefrina se desloca negativamente com o aumento do potencial.

Por voltametria cíclica e cronoamperometria, verificou-se que um eléctrodo de ouro modificado com um enzima (lacase) e NPs imobilizados com CS<sub>2</sub> tem atividade catalítica para um composto fenólico (ABTS). Por cronoamperometria, observou-se que o eléctrodo **Au(111)/CS<sub>2</sub>/Lacase** atinge o pico de redução máximo entre 8 e 10  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de ABTS, com uma densidade de corrente máxima de  $0.11 \mu\text{A cm}^{-2}$ . Na presença das nanopartículas (NP60), a saturação do enzima ocorre a uma concentração ligeiramente superior, 12  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , e com uma densidade de corrente máxima significativamente mais elevada,  $i_{\text{max}} = 0.58 \mu\text{A cm}^{-2}$ .

A caracterização dos eléctrodos **Au(111)/CS<sub>2</sub>/NP60**, **Au(111)/CS<sub>2</sub>/NP60/epinefrina** e **Au(111)/CS<sub>2</sub>/NP60/Lacase** por AFM, permitiu confirmar uma imobilização estável das nanopartículas, e destas na presença de epinefrina e lacase. Observou-se ainda uma diferente distribuição de partículas na superfície de ouro, dependendo da formação de ditiocarbamato, ou seja, apenas na presença de CS<sub>2</sub> as NPs têm mais tendência para se interligarem. Quando ocorre a funcionalização das nanopartículas, estas encontram-se distribuídas de forma mais uniforme sobre a superfície de ouro. A funcionalização das nanopartículas de óxido de ferro através da formação de ditiocarbamatos, foi comprovada por espectroscopia de UV-Vis. Deste modo é possível concluir que é exequível a funcionalização das nanopartículas de óxido de ferro com CS<sub>2</sub>.

De forma a complementar este trabalho, poder-se-ia realizar um estudo sistemático por AFM e microbalança de cristal de quartzo, de forma a relacionar a quantidade de NPs adsorvidas com o seu comportamento redox. A técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica poderia ainda elucidar o papel das NPs como facilitadoras do processo de transferência eletrónica, especialmente na presença de enzimas. Embora se tenha comprovado que a nova metodologia proposta para funcionalizar nanopartículas de ferro, é uma alternativa vantajosa na preparação de superfícies transdutoras em biosensores, é ainda necessário otimizar a metodologia, nomeadamente, o tempo de vida do eléctrodo, a reprodutibilidade, e o alargamento a outras biomoléculas.





## **Referências Bibliográficas**



- [1] B. D. Malhotra, A. P. F. Turner, *Perspectives in Biosensors*, JAI Press, Amsterdam; London, **2003**.
- [2] H. Nakamura, I. Karube, *Anal. Bional. Chem* **2003**, 377, 446–468.
- [3] F. J. Holler, D. A. Skoog, S. R. Crouch, C. Pasquini, *Princípios de análise instrumental*, Bookman, Porto Alegre, **2009**.
- [4] A. S. Alfaya, L. Kubota, *Química Nova* **2008**, 25, 835–841.
- [5] J. Wang, *Chemical Reviews* **2008**, 108, 814–825.
- [6] O. F. Fatibello, M. D. Capelato, *Química Nova* **1991**, 15, 28–39.
- [7] A. Chaubey, B.D. Malhotra, *Biosensors & Bioelectronics* **2002**, 17, 441–456.
- [8] S. K. Arya, M. Datta, B. D. Malhotra, *Biosensors and Bioelectronics* **2008**, 23, 1083–1100.
- [9] P. Du, B. Zhou, C. Cai, *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2008**, 614, 149–156.
- [10] A. Quintas, A. P. Freire, M. J. Halpern, *Bioquímica: organização molecular da vida*, Lidel, Lisboa, **2007**.
- [11] H. L. Schmidt, W. Schuhmann, *Biosensors and Bioelectronics* **1996**, 11, 127–135.
- [12] A. F. Melo, Desenvolvimento Preliminar de Um Biossensor Enzimático Para Determinação de Taninos Hidrolisáveis, Dissertação de Mestrado, Univ. Federal do R. Janeiro, **2008**.
- [13] L. Giorno, E. Drioli, *Tibtech* **2000**, 18, 339–349.
- [14] G. Fernández-Lorente, R. Fernández-Lafuente, J. M. Palomo, C. Mateo, A. Bastida, J. Coca, T. Haramboure, O. Hernández-Justiz, M. Terreni, J. M. Guisán, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2001**, 11, 649–656.
- [15] C. Mateo, O. Fernández-Lafuente, J. M. Guisán, *Enzyme and Microbial Technology* **2000**, 26, 509–515.
- [16] G. C. Luca, B. F. Reis, *Química Nova* **2001**, 24, 191–194.
- [17] B. Krajewska, *Enzyme and Microbial Technology* **2004**, 35, 126–139.
- [18] B. Krajewska, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2009**, 59, 22–40.
- [19] S. F. D'Souza, S. S. Godbole, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* **2002**, 52, 59–62.
- [20] Q. Sheng, K. Luo, L. Li, J. Zheng, *Bioelectrochemistry* **2009**, 74, 246–253.
- [21] A. J. Bard, M. Stratmann, *Encyclopedia of Electrochemistry* **2007**, 10, 775.
- [22] I. Almeida, V. C. Ferreira, M. F. Montemor, L. M. Abrantes, A. S. Viana, *Electrochimica Acta* **2012**, 83, 311–320.
- [23] X. Wang, X. Zhang, *Electrochimica Acta* **2013**, 112, 774–782.
- [24] Y. L. Wu, Q. W. Li, X. L. Zhang, X. Chen, X.-M. Wang, *Chinese Chemical Letters* **2013**, 24, 1087–1090.
- [25] G. K. Kouassi, J. Irudayaraj, G. McCarty, *BioMagnetic Research and Technology* **2005**, doi:10.1186/1477-044X-3-1.
- [26] K. Aguilar-Arteaga, J. A. Rodriguez, E. Barrado, *Analytica Chimica Acta* **2010**, 674, 157–165.
- [27] A. Kaushik, R. Khan, P. R. Solanki, P. Pandey, J. Alam, S. Ahmad, B. D. Malhotra, *Biosensors and Bioelectronics* **2008**, 24, 676–683.
- [28] P. A. Johnson, H. J. Park, A. J. Driscoll, in *Enzyme Stabilization and Immobilization* (Ed.: S.D. Minter), Humana Press, Totowa, NJ, **2011**, pp. 183–191.
- [29] L. Yang, X. Ren, F. Tang, L. Zhang, *Biosensors and Bioelectronics* **2009**, 25, 889–895.

- [30] D. Baratella, M. Magro, G. Sinigaglia, R. Zboril, G. Salviulo, F. Vianello, *Biosensors and Bioelectronics* **2013**, *45*, 13–18.
- [31] N. Wu, S. Y. Wang, C. Han, D. Wu, L. Shiue, *Journal of Power Sources* **2003**, *113*, 173–178.
- [32] C. G. C. M. Netto, H. E. Toma, L. H. Andrade, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2013**, *85-86*, 71–92.
- [33] P. Majewski, B. Thierry, *Critical Reviews in Solid State and Materials Sciences* **2007**, *32*, 203–215.
- [34] M. D. Carvalho, F. Henriques, L. P. Ferreira, M. Godinho, M. M. Cruz, *Journal of Solid State Chemistry* **2013**, *201*, 144–152.
- [35] M.E. Compeán-Jasson, F. Ruiz, J.R. Martínez, A. Herrera-Gómez, *Materials Letters* **2008**, *62*, 4248–4250.
- [36] S. K. Arya, P. R. Solanki, M. Datta, B. D. Malhotra, *Biosensors and Bioelectronics* **2009**, *24*, 2810–2817.
- [37] P. Morf, F. Raimondi, H. G. Nothofer, B. Schnyder, A. Yasuda, J. M. Wessels, T. A. Jung, *Langmuir* **2006**, *22*, 658–663.
- [38] A. Ulman, *Chemical Reviews* **1996**, *96*, 1533–1554.
- [39] F. Schreiber, *Progress in Surface Science* **2000**, *65*, 151–256.
- [40] L. H. Dubois, R. G. Nuzzo, *Annual Review of Physical Chemistry* **1992**, *43*, 437–463.
- [41] C. D. Bain, G. M. Whitesides, *Angewandte Chemie International Edition* **1989**, *28*, 506–512.
- [42] H. O. Finklea, *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, John Wiley & Sons Lda, USA, **2000**.
- [43] V. C. Ferreira, A. F. Silva, L. M. Abrantes, *Journal of Physical Chemistry C* **2010**, *114*, 7710–7716.
- [44] J. F. Cabrita, L. M. Abrantes, A. S. Viana, *Electrochimica Acta* **2005**, *50*, 2117–2124.
- [45] Y. Zhao, W. Pérez-Segarra, Q. Shi, A. Wei, *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, 7328–7329.
- [46] H. Zhu, D. M. Coleman, C. J. Dehen, I. M. Geisler, D. Zemlyanov, J. Chmielewski, G. J. Simpson, A. Wei, *Langmuir* **2008**, *24*, 8660–8666.
- [47] I. Almeida, A. C. Cascalheira, A. S. Viana, *Electrochimica Acta* **2010**, *55*, 8686–8695.
- [48] B. M. Bull, **1973**, *29*, 105–109.
- [49] G. Hong, D. M. Ivnitski, G. R. Johnson, P. Atanassov, R. Pachter, *Journal of the American Chemical Society* **2011**, *133*, 4802–4809.
- [50] J. P. Kallio, J. Rouvinen, K. Kruus, N. Hakulinen, *Biochemistry* **2011**, *50*, 4396–4398.
- [51] F. P. Cardoso, S. A. Neto, P. G. Fenga, P. Ciancaglini, A. R. De Andrade, *Electrochimica Acta* **2013**, *90*, 90–94.
- [52] S. A. S. S. Gomes, M. J. F. Rebelo, *Sensors* **2003**, *3*, 166–175.
- [53] R. S. Freire, N. Dúran, L.T. Kubota, *Talanta* **2001**, *54*, 681–686.
- [54] S. S. Rosatto, R. S. Freire, N. Durán, L. Kubota, *Química Nova* **2001**, *24*, 77–86.
- [55] O. D. Leite, K. O. Lupetti, O. Fatibello-Filho, I. C. Vieira, A. M. Barbosa, *Talanta* **2003**, *59*, 889–896.
- [56] A. J. Bard, L. R. Faulkner, *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, John Wiley & Sons, New York, **2001**.
- [57] P. T. Kissinger, W. R. Heineman, *Journal of Chemical Education* **1983**, 702–706.
- [58] R. S. Nicholson, *Analytical Chemistry* **1965**, 1351–1355.

- [59] Southampton Electrochemistry Group, *Instrumental Methods in Eletrochemistry*, Ellis Horwood Limited, **1985**.
- [60] A. M. O. Brett, C. M. A. Brett, *Eletroquímica: Princípios, Métodos e Aplicações*, Edições Almedina, **1996**.
- [61] R.A. Marcus, *Advances in Chemistry Series* **1965**, 50, 138-148.
- [62] A. L. Eckermann, D. J. Feld, J. A. Shaw, T. J. Meade, *Coordination Chemistry Reviews* **2010**, 254, 1769-1802.
- [63] F. Vianello, A. Cambria, M. S. Ragusa, M. T. Cambria, L. Zennaro, A. Rigo, *Biosensors and Bioelectronics* **2004**, 2, 315-325.
- [64] F. Xu, *Journal of Biological Chemistry* **1997**, 272, 924-928.
- [65] C. E. Bach, D. D. Warnock, D. J. Van Horn, M. N. Weintraub, R. L. Sinsabaugh, S. D. Allison, D. P. German, *Soil Biology and Biochemistry* **2013**, 67, 183-191.
- [66] N. Gadegaard, *Biotechnic & Histochemistry* **2006**, 81, 87-97.
- [67] D. Rugar, P. Hansma, *Physics Today* **1990**, 43, 23-30.
- [68] W. R. Bowen, N. Hilal, *Atomic Force Microscopy in Process Engineering: Introduction to AFM for Improved Processes and Products*, Elsevier/Butterworth-Heinemann, Amsterdam, **2009**.
- [69] A. P. da G. da S. Viana, "Preparation, Electrochemical and Optical Characterisation of Modified Electrodes by Self-assembled Monolayers," Tese de doutoramento em Química apresentada à Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, **2002**.
- [70] Park Scientific Instruments, *A Practical Guide to Scanning Probe Microscopy*, **1996**.
- [71] Angelo Fernando Padilha, "Microscopia Eletrônica de Transmissão," can be found under [http://www.angelfire.com/crazy3/qfl2308/1\\_multipart\\_xF8FF\\_3\\_MET\\_PMI-2201.pdf](http://www.angelfire.com/crazy3/qfl2308/1_multipart_xF8FF_3_MET_PMI-2201.pdf), consultado em Agosto - Dezembro 2013.
- [72] J. I. Goldstein, D. E. Newbury, P. Echlin, D. C. Joy, C. E. Lyman, E. Lifshin, L. Sawyer, J. R. Michael, *Scanning Electron Microscopy and X-ray Microanalysis*, Springer US, Boston, MA, **2003**.
- [73] G. Britton, *ChemInform* **2010**, 26, no-no.
- [74] D. Nascimento dos Santos, G. N. Neves, R. N. Consolação e Branco, "Espectroscopia na região do ultravioleta/visível," can be found under <http://pt.scribd.com/doc/53575282/Espectroscopia-na-Regiao-do-UV-VIS>, consultado em Agosto - Dezembro 2013.
- [75] P. D. Allen, N. A. Hampson, J. F. Tyson, G.J. Bignold, *Surf. Technol.* **1979**, 9, 395.
- [76] S. C. Pang, S. F. Chin, M. A. Anderson, *Journal of Colloid and Interface Science* **2007**, 311, 94-101.
- [77] A. Rodríguez-López, D. Torres-Torres, J. Mojica-Gomez, C. Estrada-Arteaga, R. Antaño-López, *Electrochimica Acta* **2011**, 56, 8078-8084.
- [78] C. M. Das, M. Sudersanan, *Journal of Applied Electrochemistry* **2003**, 33, 333-338.
- [79] J. W. Halley, A. Schofield, B. Berntson, *Journal of Applied Physics* **2012**, 111, 124911.
- [80] S. Joiret, M. Keddah, X. R. Novoa, M. C. Perez, C. Rangel, H. Takenouti, *Cement & Concrete Composites* **2002**, 24, 7-15.
- [81] P. Encinas, L. Lorenzo, M.L. Tascón, M. D. Vázquez, P. Sánchez-Batanero, *Journal of Electroanalytical Chemistry* **1994**, 371, 161-166.
- [82] J. F. Cabrita, A. S. Viana, C. Eberle, F. P. Montforts, A. Mourato, L. M. Abrantes, *Surface Science* **2009**, 603, 2458-2462.
- [83] J. T. Marquês, R. F. M. de Almeida, A. S. Viana, *Soft Matter* **2012**, 8, 2007-2016.

- [84] J. Bisquert, F. Fabregat-Santiago, I. Mora-Seró, G. Garcia-Belmonte, E. M. Barea, E. Palomares, *Inorganica Chimica Acta* **2008**, 361, 684–698.
- [85] A. I. Eckermann, J. A. Shaw, T. J. Meade, *Langmuir* **2010**, 26, 2904–2913.
- [86] M. Motaghedifarda, S. M. Ghoreishi, M. Behpour, Z. Moghadam, M. Salavati-Niasari, *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2012**, 682, 14–22.
- [87] T. Łuczak, M. Bełtowska-Brzezinska, *Electrochimica Acta* **2013**, 90, 634–640.
- [88] R. N. Goyal, A. R. S. Rana, M. A. Aziz, M. Oyama, *Analytica Chimica Acta* **2011**, 693, 35–40.
- [89] Y. Niu, A. I. Matos, L. M. Abrantes, A. S. Viana, G. Jin, *Langmuir* **2012**, 28, 17718–17725.
- [90] Z. Tao, G. Wang, J. Goodisman, T. Asefa, *Langmuir* **2009**, 25, 10183–10188.
- [91] R. Bourbonnais, D. Leech, M. G. Paice, *Biochimica et Biophysica Acta* **1998**, 1379, 381–390.
- [92] A. M. Mayer, R. C. Staples, *Phytochemistry* **2002**, 60, 551–565.
- [93] I. Zawista, J. Rogalski, M. Opallo, *Journal of Electroanal. Chem.* **2006**, 588, 244.
- [94] F. D. Munteanu, C. Basto, G. M. Guñbitz, A. Cavaco-Paulo, *Ultrasonics Sonochemistry* **2007**, 14, 363–367.
- [95] K. Matilainen, T. Hämäläinen, A. Savolainen, T. Sipiläinen-Malm, J. Peltonen, T. Erho, M. Smolander, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2012**, 90, 119–128.
- [96] Y. Liu, X. Qu, H. Guo, H. Chen, B. Liu, S. Dong, *Biosensors and Bioelectronics* **2006**, 21, 2195–2201.
- [97] A. Jaroszwilkolazka, T. Ruzgas, L. Gorton, *Talanta* **2005**, 66, 1219–1224.
- [98] Yi Zhang, Guang-Ming Zeng, Lin Tang, Dan-Lian Huang, Xiao-Yun Jiang, Yao-Ning Chen, *Biosensors and Bioelectronics* **2007**, 22, 2121–2126.
- [99] “ExPASy - ProtParam tool,” can be found under <http://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam>, consultado em Agosto-Setembro 2013.



## Anexo

### Lacase

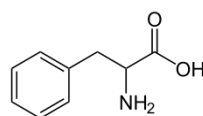
Número de aminoácidos: 521

Peso molecular: 55828.4

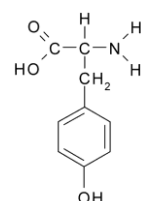
pI: 4.61

#### Composição de aminoácidos:

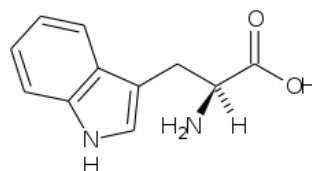
Alanina (A)	55	10.6%
Arginina (R)	15	2.9%
Asparagina (N)	36	6.9%
Aspartato (D)	40	7.7%
Cisteína (C)	7	1.3%
Glutamina (Q)	17	3.3%
Glutamato (E)	10	1.9%
Glicina (G)	40	7.7%
Histidina (H)	17	3.3%
Isoleucina (I)	31	6.0%
Leucina (L)	32	6.1%
Lisina (K)	6	1.2%
Metetionina (M)	4	0.8%
Fenilalanina (F)	30	5.8%
Prolina (P)	41	7.9%
Serina (S)	36	6.9%
Treonina (T)	39	7.5%
Triptofano (W)	7	1.3%
Tirosina (Y)	16	3.1%
Valina (V)	40	7.7%



Fenilalanina



Tirosina



Triptofano